

Université de Montréal

**Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs
des estrogènes (ER) par le récepteur aux chimiokines
CXCR7 et par la propyl isomérase Pin1**

Par Samira Benhadjeba

Département de biochimie et de médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

en Biochimie

Décembre, 2017

© Samira Benhadjeba, 2017

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

**Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs
des estrogènes (ER) par le récepteur aux chimiokines
CXCR7 et par la propyl isomérase Pin1**

Présentée par
Samira Benhadjeba

Évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Tony Antakly, président rapporteur

André Tremblay, directeur de recherche

Johnny Deladoëy, membre du jury

Éric Asselin, examinateur externe

Audrey Claing, représentante du doyen de la FES

Résumé

La signalisation des récepteurs aux estrogènes, ER α et ER β , est largement impliquée dans le développement, la croissance et la progression des cancers hormono-dépendants, notamment le cancer des ovaires et le cancer du sein. Dans le cancer épithélial de l'ovaire, nous avons identifié une boucle de régulation positive entre le récepteur des chimiokines CXCR7 et le récepteur aux estrogènes ER α . D'abord, L'expression de CXCR7 et son ligand I-TAC est régulée à la hausse dans les cellules cancéreuses ovariennes ER+, et cette régulation est médiée par ER α et E2. L'analyse intégrative des données des gènes TCGA pour le cancer épithélial séreux de haut grade révèle une corrélation positive entre l'expression de CXCR7 et ER α . De plus, les essais d'immunoprécipitation de la chromatine et de luciférase démontrent que E2-ER α se lie à un ERE situé dans le promoteur de CXCR7 et active son expression. Ensuite, CXCR7 à son tour régule ER α en augmentant son activité transcriptionnelle induite par E2 tout en impliquant la pSer-118 de ER α . Des résultats préliminaires montrent que la phosphorylation de la Ser-118 induite par E2 est amplifiée par CXCR7. En outre, le knock-down de CXCR7 altère l'expression des marqueurs de transition épithéliale-mésenchymateuse tels que E-cadhérine, N-cadhérine et Snail, suggérant que la déplétion de CXCR7 pourrait réguler négativement les voies de signalisation EMT induites par les estrogènes pendant la migration des cellules cancéreuses ovariennes.

Dans le cancer du sein, nous avons identifié un mécanisme par lequel l'isomérase Pin1 régule l'activité transcriptionnelle de ER β . Nous avons trouvé que ER β phosphorylée constitue un substrat pour Pin1. Dans ce contexte, Pin1 interagit avec ER β et cette interaction est augmentée par E2. L'effet de cette interaction a pour conséquence d'augmenter l'activité

transcriptionnelle de ER β , et ce, à travers la phosphorylation de la sérine-87 de ER β qui est ciblée par ERK1/2. En outre, l'interaction de Pin1 avec ER β favorise la stabilité de ER β tout en augmentant la migration des cellules cancéreuses mammaires induite par E2-ER β .

Mots-clés : récepteurs aux estrogènes, ER, estrogènes, CXCR7, gène cible, activation, Pin1, cancer du sein, cancer épithélial de l'ovaire

Abstract

Estrogen receptors signaling, ER α and ER β , is largely involved in the development, growth and progression of hormone-dependent cancers, including ovarian and breast cancer. In epithelial ovarian cancer, we identified a positive regulatory loop between the chemokine receptor CXCR7 and ER α . First, the expression of CXCR7 and its ligand I-TAC is upregulated in ovarian cancer cells ER $^+$ and this up-regulation is mediated by ER α and E2. Integrative analysis of TCGA gene data for high grade serous epithelial carcinoma reveals a positive correlation between CXCR7 and ER α expression. In addition, the chromatin immunoprecipitation and luciferase assays demonstrate that E2-ER α binds to an ERE located in the CXCR7 promoter and activates its expression. Next, CXCR7 in turn up-regulates ER α by increasing its E2-induced transcription through phosphorylation of pSer-118 of ER α . The phosphorylation of Ser-118 induced by E2 appears to be amplified by CXCR7. In addition, knockdown of CXCR7 alters the expression of epithelial-mesenchymal transition markers such as E-cadherin, N-cadherin, and Snail, suggesting that CXCR7 depletion might negatively regulate estrogen-induced EMT signaling pathways during the migration of ovarian cancer cells.

In breast cancer, we have identified a mechanism by which Pin1 isomerase regulates the transcriptional activity of ER β . We found that phosphorylated ER β is a substrate for Pin1. In this context, Pin1 interacts with ER β and this interaction is increased by E2. The effect of this interaction has the consequence of increasing the transcriptional activity of ER β , and this through the phosphorylation of ER β serine-87 which is targeted by ERK1/2. In addition, the interaction of Pin1 with ER β promotes the stability of ER β while increasing the migration of mammary cancer cells induced by E2-ER β .

Keywords : estrogen receptors, ER, estrogen, CXCR7, target gene, activation, Pin1, breast cancer, epithelial ovarian cancer

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	3
Table des matières.....	5
Liste des figures	9
Liste des abréviations.....	10
Remerciements.....	14
Chapitre 1 : Introduction.....	16
1. Les estrogènes.....	16
1.1. Les rôles physiologiques des estrogènes.....	18
2. Les récepteurs aux estrogènes.....	20
2.1. Structure de ER α et ER β	21
2.1.1. Le domaine AF-1	22
2.1.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)	22
2.1.3. La région charnière	23
2.1.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD)	24
2.1.1. Le domaine C-terminal	25
2.2. Les Rôles biologiques des ERs	26
2.2.1. Rôle dans le système reproducteur	27
2.2.2. Rôle dans l'os.....	28
2.2.3. Rôle dans le système cardio-vasculaire	29
2.2.4. Rôle dans le système nerveux central	30
2.3. Redondance entre ER α et ER β	31
2.4. Mécanismes de signalisation des estrogènes	32
2.4.1. Signalisation génomique directe ERE-dépendante.....	32
2.4.2. Signalisation génomique indirecte ERE-indépendante.....	33
2.4.3. Signalisation indépendante du ligand	33
2.4.4. Signalisation non-génomique.....	34
2.5. L'activation transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes.....	36

2.5.1.	Les coactivateurs.....	36
2.5.2.	Les corépresseurs.....	37
2.6.	Modulation de l'activité des récepteurs aux œstrogènes	39
2.6.1.	La phosphorylation des ERs	41
2.6.1.1.	Phosphorylation de ER α	41
2.6.1.2.	Phosphorylation de ER β	43
2.7.	Les implications pathologiques de la signalisation des récepteurs aux œstrogènes ..	45
2.7.1.	Rôle des ERs dans le cancer du sein.....	45
2.7.2.	Rôle des ERs dans le cancer épithélial de l'ovaire	47
2.8.	Les approches thérapeutiques pour antagoniser les ERs	49
2.8.1.	Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERMs)	49
2.8.2.	Les inhibiteurs des aromatasases.....	50
2.8.3.	Les dégradeurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERDs)	51
2.8.4.	Anticorps monoclonaux	52
2.8.5.	Composés interférant avec l'interaction ER-ADN	53
3.	Les chimiokines	53
3.1.	Structure des chimiokines.....	54
3.2.	Les fonctions biologiques des chimiokines	55
3.3.	Les récepteurs des chimiokines	56
3.3.1.	Le récepteur des chimiokines CXCR7.....	59
3.3.1.1.	Les ligands de CXCR7, SDF-1/CXCL12 et ITAC/CXCL11	61
3.3.2.	L'expression de CXCR7	62
3.3.3.	Régulation de l'expression de CXCR7	63
3.3.4.	Activation de CXCR7	65
3.3.5.	Signalisation de CXCR7	66
3.3.6.	Les rôles biologiques de CXCR7.....	67
3.3.7.	Les conséquences pathologiques de la signalisation de CXCR7	69
3.3.7.1.	L'axe CXCR7/SDF-1/CXCR4 dans le cancer de l'ovaire.....	71
4.	Les Peptidyl prolyl <i>cis/trans</i> isomerase (PPIases)	72
4.1.	Structure de Pin1	72
4.2.	Mécanisme d'action de Pin1	74

4.2.1.	Régulation des kinases et des phosphatases par Pin1	75
4.2.2.	Régulation transcriptionnelle par Pin1	76
4.2.2.1.	Les facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches et la pluripotence	76
4.2.2.2.	Pin1 régule les facteurs cycline D1, cycline E et c-Myc	77
4.2.2.3.	Les facteurs de transcription impliqués dans la suppression tumorale	77
4.2.2.4.	Les récepteurs nucléaires	78
4.3.	Pin1 dans le développement du cancer de sein	80
	Hypothèses et objectifs	82
	Chapitre 2: Résultats	85
	1 ^{ère} publication (soumise à <i>Molecular Oncology</i> , février 2018)	85
	Chapitre 3 Discussion générale, perspectives et conclusion	140
	Discussion	140
1.	Contrôle par rétroaction positive de l'axe des chimiokines CXCR7 par le récepteur des estrogènes	140
1.1.	L'expression du gène CXCR7 est régulée par l'estrogène et ER α	140
1.2.	Corrélation entre l'expression génique de CXCR7 et I-TAC avec ER α dans les tumeurs ovariennes humaines	142
1.3.	Identification d'un ERE fonctionnel dans le promoteur de CXCR7	143
1.4.	CXCR7 peut promouvoir l'activité transcriptionnelle de ER α	144
1.5.	Le rôle de CXCR7 dans la migration des cellules cancéreuses ovariennes	145
2.	Identification d'un mécanisme par lequel ER β est activé par Pin1	148
2.1.	Interaction entre Pin1 et ER β	148
2.2.	Régulation de l'activité transcriptionnelle de ER β par Pin1	149
2.3.	Implication de Pin1 dans la migration des cellules cancéreuses mammaires induite par E2	151
	Perspectives	153
	Étudier le potentiel de CXCR7 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique dans le cancer de l'ovaire	153
	ER β peut-il influencer le couplage entre CXCR7 et ER α ?	154
	L'implication de Pin1 dans la résistance au tamoxifène	155

Implication de la sérine-87 dans la pathogénicité du cancer du sein	156
Conclusion	158
Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1.	La synthèse de l'estrogène dans les ovaires.....	18
Figure 2.	Structure des récepteurs aux estrogènes.	21
Figure 3.	Éléments de réponse aux estrogènes.....	23
Figure 4.	Distribution tissulaire de ER dans l'organisme.	27
Figure 5.	Les différents mécanismes d'actions des récepteurs aux estrogènes.....	35
Figure 6.	Les co-régulateurs transcriptionnels des ERs.	38
Figure 7.	Représentation des différents sites de phosphorylation sur les ERs.	44
Figure 8.	Configuration des 4 classes de chimiokines.	55
Figure 9.	Structure générale des récepteurs des chimiokines.....	58
Figure 10.	Changement conformationnel catalysé par l'isomérase.	73

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Activation function
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AP-1	Activating protein 1
CARM1	Co-activator Associated arginine Methyl Transferase
CBP	CREB-binding protein
CCND1	Cycline D1
CD :	Dendritic cells
CDK	Cyclin-dependent kinases
CDK7	Cyclin-dependent kinase 7
CSH :	Cellules souches hématopoïétiques
I-TAC	Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
SDF-1 et	Stromal cell-derived factor-1
CyP	Cyclophilines
DBD	DNA Binding Domaine
DIBA	Dithiobisbenzamide
DRIP205	Vitamin D-interacting Protein 205
E1	Estrone
E2	Estradiol
E3	Estriol
EGF	Epidermal growth factor
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase 3
ERE	Estrogen Response Element
ERs	Estrogen receptors
ER α	Estrogen receptors α
ER β	Estrogen receptor β
FGF	Fibroblast Growth Factor

FKBP	FK506 binding protein
FSH	Follicular stimulating hormone
GPCR	G protein coupled receptor
GPER	G protein estrogen receptor
GSK-3	Kinase Glycogène synthase 3
HDAC	Histone desacétyle
HDL	Lipoprotéines de haute densité
Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
Hsp90	Heat shock protein 90
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IKK α	Inhibitory Kappa B Kinase α
IL-8	Interleukin-8
KO	Knockdown
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
LBD	Ligand binding domain
LDL	Low density lipoprotein
PPIases	Peptidyl prolyl cis/trans isomerase
LH	Luteinising hormone
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Michigan cancer foundation-7
MPT	Modifications post-traductionnelles
N-CoR	Nuclear Hormone Corepressor
NF-kB	Nuclear factor kappa B
NIMA	never in mitosis gene A
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
OVCAR-3	Ovarian cancer 3

PDGF	Platelet-derived growth factor
Pin1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PKA	Protéine kinase A
PML	Promyelocytic leukemia protein
PP2A	Protein phosphatase 2
PPIase	Peptidyl prolyl isomérases
PRMT1	Protein Arginine Methyl Transferase 1
RIP140	Receptor Interacting Protein 140
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
SCID	Severe combined immunodeficiency
SERDs	Selective estrogen receptor downregulators
SERMs	Selective estrogen receptor modulators
SMART	Silencing Mediator of Retinoic and thyroid hormone Receptors
sp1	Specificity protein 1
SRC	Steroid receptor coactivator
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TGF- β	Transforming growth factor beta
TH2	Type 2 helper
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPBM	Theophylline, 8-[(benzyltiol)methyl]
TRAP220	Thyroid receptor-associated proteincomplex 220 kDa
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Je dédie mon travail à Meriem, la prunelle de mes yeux

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier sincèrement mon directeur de recherche le Dr. André Tremblay d'avoir eu confiance en moi en m'accueillant dans son laboratoire et me donner l'opportunité d'y faire mon stage de bac, ma maîtrise et mon doctorat. Les années que j'ai passées dans ton laboratoire sous ta supervision ont été des plus belles années de ma vie. Tu m'as fait profiter de ton savoir-faire sur le plan scientifique et sur le plan personnel. Je te remercie d'avoir été le directeur qui a su croire en moi et en mes compétences dans les bons moments aussi bien que dans les moments difficiles quand les expériences ne marchaient pas. Je te remercie pour ton aide et ton accompagnement tout au long et après. Je te remercie pour ta générosité quand tu partageais tes idées et pour ton appui, tes compétences, ta grande patience et ta disponibilité pendant tout ce temps.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, les Drs. Tony Antakly et Johnny Deladoëy pour leur contribution au bon déroulement de mon travail. Grâce à leurs commentaires, critiques, suggestions, mon travail a gagné en perfectionnement et en précision.

Un grand merci aux membres du jury les Drs. Tony Antakly, Johnny Deladoëy et Éric Asselin pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour tout le temps qu'ils y ont consacré.

Je remercie aussi également mes collègues de laboratoire en particulier Lydia Edjekouane, merci pour ta patience et ta grande disponibilité à répondre à mes nombreuses questions, merci pour avoir partagé ton expertise scientifique qui rendait ma vie de bench plus simple. Merci d'avoir été la collègue, l'amie et la confidente. Merci à Karine Sauvé. Bien que tu n'étais plus au laboratoire au cours de mon doctorat, tes idées et tes conseils que tu m'avais

donnés durant mon stage et ma maîtrise, m'ont accompagné jusqu'au bout. Merci aussi à Stéphanie Bilodeau, Jonathan Gagnon et la brillante assistante de recherche Véronique Caron. Merci à vous pour m'avoir aidé avec vos compétences dans des techniques qui étaient indispensables pour l'accomplissement de ma thèse.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Leurs attentions et encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Je suis redevable à mes parents pour leur confiance indéfectible dans mes choix, et je suis reconnaissante à ma sœur Feiza et mon amie Nesrine, pour leur soutien moral.

Je remercie mon mari Boumediene, qui a toujours su m'appuyer, et si je me suis rendue aussi loin dans le parcours de mes études c'est certainement grâce à toi. À travers ce travail j'espère te rendre fière de moi et fière de tout le temps que tu as consacré à mettre tous les moyens en ma faveur durant ces années de doctorat.

Je remercie aussi mon rayon de soleil, ma fille Meriem. Malgré ton jeune âge et ton besoin de m'avoir disponible, tu as toujours été compréhensive quand maman avait un travail à remettre, un examen à passer, une thèse à écrire ...

Chapitre 1 : Introduction

1. Les estrogènes

Les estrogènes appartiennent à la grande famille des hormones stéroïdiennes, ils sont principalement responsables du développement du caractère sexuel féminin. Physiologiquement, les estrogènes incluent l'estrone (E1), le 17β -estradiol (E2), et l'estriol (E3). Les trois formes d'estrogène sont produites à partir du cholestérol suite à des réactions en série. E2 est l'estrogène le plus puissant durant la période de pré-ménopause dans la vie d'une femme. E1 joue un plus grand rôle après la ménopause, il est synthétisé dans le tissu adipeux par aromatisation de la déhydroépiandrostérone (DHEA) surrénale. E3 est l'estrogène le moins puissant, il est formé à partir de E1 par l'entremise de la 16α -hydroxylation. Il joue un rôle plus important pendant la grossesse où il est produit en grandes quantités par le placenta (1).

Avant la puberté et après la ménopause, la synthèse des estrogènes se fait principalement dans les tissus périphériques tels que les reins, les tissus adipeux, la peau et le cerveau. L'estrogène synthétisé dans ces tissus agit localement afin de maintenir des fonctions tissulaires spécifiques à chaque organe (2). Par exemple, au niveau de la peau, les estrogènes agissent en accélérant la cicatrisation cutanée (3). Dans les reins, les estrogènes sont habituellement considérés comme étant néoprotecteurs car non seulement ils agissent comme anti-inflammatoires, mais aussi ils inhibent l'apoptose dans les cellules mésangiales (4, 5). Ces différentes sources tissulaires des estrogènes jouent un rôle important après la ménopause (6). En plus de ces tissus, en âge de procréer, la synthèse des estrogènes se fait aussi par les ovaires, le corps jaune et le placenta (7). Chez l'homme, les estrogènes sont produits par les testicules

au niveau des cellules de Sertoli (8) qui sont les cellules somatiques du testicule, essentielles à la formation des testicules et à la spermatogenèse (9)

La production des estrogènes dans les ovaires commence par la synthèse de la prégnénolone à partir du cholestérol. Cette réaction est catalysée par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cytochrome P450 (P450_{scc}) (Figure 1). Ensuite, la prégnénolone est convertie en progestérone à la fois dans les cellules de la thèque et de granulosa par la 3-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD). La 3 β -HSD est une enzyme mitochondriale liée à la membrane qui conduit à la formation de la progestérone à partir de la prégnénolone, et d'androstènedione à partir de DHEA par la catalyse de la conversion de Δ 5-3 β -hydroxystéroïde en Δ 4-3 β -cétostéroïdes (10). Par la suite, La progestérone est convertie en androgènes via la 17 α -hydroxylase (P450_{17 α}) du cytochrome P450 et la 17-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD), et ce, dans les cellules de thèques pendant la phase folliculaire. La distribution tissulaire généralisée de l'activité de la 17 β -HSD chez l'homme joue un rôle majeur dans l'activation intracrine et l'inactivation des hormones sexuelles stéroïdiennes, formées localement à partir de la déhydroépiandrostérone circulante (DHEA) (11). Finalement, la conversion en E2 est catalysée par l'aromatase (P450_{Arom}) dans les cellules granulosa (6). En fait, L'aromatase appartient à la superfamille du cytochrome P450. La P450_{Arom} est largement exprimée dans de nombreux sites: cerveau, gonades, vaisseaux sanguins, foie, os, peau, le tissu adipeux et l'endomètre (12). Alors que dans l'ovaire, l'aromatase n'est exprimée que dans les cellules de la granulosa et de la lutéale, dans les gonades mâles, cette enzyme est largement exprimée dans les testicules maintenant les niveaux élevés d'E2 nécessaires pour la spermiogenèse normale, la maturation des spermatozoïdes et la mobilité des spermatozoïdes (13).

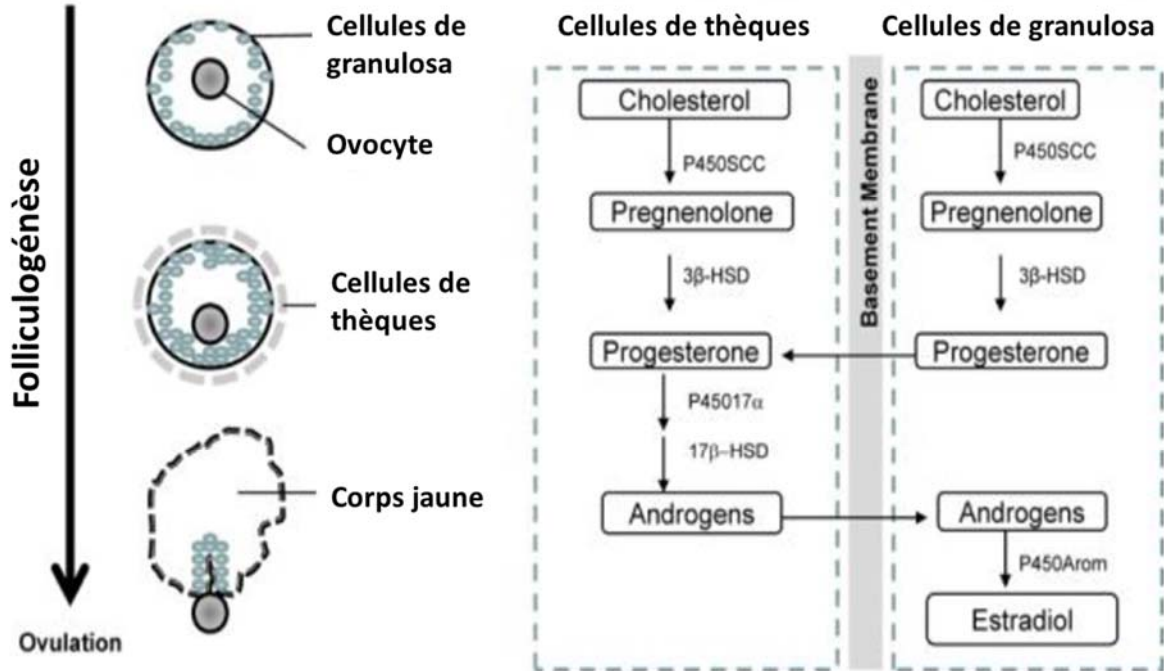


Figure 1. La synthèse de l'estrogène dans les ovaires.

Durant la folliculogénèse, les cellules thécales et granuleuses sont impliquées dans la synthèse des œstrogènes. Les cellules thécales ne peuvent produire de l'estrogène mais produisent des androgènes; inversement, les cellules de granulosa ne peuvent produire les androgènes à partir de la progestérone, mais peuvent convertir l'androgène en E2. Adapté de (6)

1.1. Les rôles physiologiques des estrogènes

Étant la principale hormone sexuelle féminine, l'estrogène est responsable du développement et de la régulation du système reproducteur féminin et des caractéristiques sexuelles secondaires. De plus, les estrogènes sont impliqués dans plusieurs aspects de la physiologie humaine, notamment dans la croissance, le développement et la différenciation des systèmes reproducteurs mâles et femelles. Chez les femmes, ils stimulent la croissance et la maturation des organes reproducteurs durant la puberté. Durant la grossesse, les estrogènes

stimulent la croissance de l'utérus et agissent sur le développement des glandes mammaires (14). Chez les hommes, l'estrogène est responsable de la maturation des spermatozoïdes (15).

Les estrogènes agissent aussi sur le système cardiaque, ils ont des effets cardioprotecteurs. Ils stimulent l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) et la prostacycline dans les cellules endothéliales (17), ce qui induit une vasodilatation rapide et de courte durée. En effet, la prostacycline (PGI₂) qui est générée par la paroi vasculaire est un puissant vasodilatateur (18) et l'acide nitrique synthétisé (NO) dans l'endothélium vasculaire par eNOS, joue un rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaires et dans la dilatation de tous les types de vaisseaux sanguins. Les LDL (low density lipoproteince) sont les principaux transporteurs de cholestérol vers les cellules. Une accumulation extracellulaire de lipides dérivés de LDL sous la forme de petites gouttelettes de lipides et de vésicules, peut conduire au développement de lésions athérosclérotiques dans l'intima artérielle (19, 20). Chez les femmes ménopausées qui suivent l'hormonothérapie, il a été observé que les estrogènes diminuent les taux de LDL et c'est ce qui confère un rôle anti-athérosclérotique des estrogènes (21).

Dans le système osseux, les estrogènes protègent contre la résorption osseuse. Ils inhibent les ostéoclastes, permettant de réduire les risques de fractures chez les femmes souffrant d'ostéoporose (22). Chez les deux sexes, l'estrogène est responsable de la fermeture de la plaque de croissance épiphysaire lors de la puberté (23). Le mécanisme cellulaire par lequel la fermeture de la plaque épiphysaire se produit est basé sur la fusion épiphysaire qui surgit lorsque le taux de prolifération des chondrocytes s'approche de zéro. Ce sont les estrogènes qui provoquent cet épuisement prolifératif et la fusion épiphysaire (24). De plus, les estrogènes agissent comme neuro-protecteurs en contribuant au remodelage synaptique et dendritique (25). Au niveau du système nerveux, la propriété antioxydante des estrogènes réduit la génération

des peptides β -amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (26). C'est pourquoi Mulnard suggère que le risque de cette maladie chez les femmes post ménopausée serait relié à la chute de production des estrogènes (27).

Étant donné que les estrogènes influencent de nombreux processus physiologiques chez les mammifères tel que la reproduction, la santé cardiovasculaire et l'intégrité osseuse, il ne serait pas surprenant que les œstrogènes soient également impliqués dans le développement ou la progression de nombreuses pathologies, notamment les cancers du sein, de l'ovaire, du côlon, de la prostate et de l'endomètre, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, la résistance à l'insuline et l'obésité. Dans la plupart de ces maladies, l'estrogène exerce ses effets par l'intermédiaire des récepteurs aux estrogène (28).

2. Les récepteurs aux estrogènes

La première découverte de récepteurs à estrogènes remonte aux travaux de Jensen dans les années 50 (29, 30). Par la suite, trois formes de récepteurs aux estrogènes ont été identifiées, soient $ER\alpha$, $ER\beta$ et GPER1/GPR-30 (G protein-coupled estrogen receptor) (31-34). Les trois formes sont codées par différents gènes situés sur différents chromosomes. $ER\alpha$ est codé par le gène *ESR1* situé sur le chromosome 6; $ER\beta$ est codé par le gène *ESR2* situé sur le chromosome 14 (35); et GPER1/GPR-30 est codé par le gène *GPER* situé sur le chromosome 7 (36). Alors que GPER1/GPR-30 est un récepteur membranaire couplé à la protéine, $ER\alpha$ et $ER\beta$ sont des facteurs de transcription appartenant à la grande famille des récepteurs nucléaires. Les trois types de récepteurs jouent un rôle dans la modulation de la transcription des gènes cibles affectant une grande variété de réponses physiologiques dans divers organes, notamment les seins, les ovaires, le cœur, le cerveau, le foie. La transduction des signaux d'estrogène par $ER\alpha$

et ER β déclenche des événements biologiques qui durent des heures ou mêmes des jours, tandis que GPER1/GPR-30 active la cascade de signalisation EGFR (Filardo et al., 2000) similaire à celle des GPCR. Cette signalisation se produit en ordre de quelques secondes (37). En fait, cette thèse, traitera principalement le rôle de ER α et ER β les le cancer des ovaires et le cancer du sein. C'est pourquoi GPR-30 ne sera pas discuté dans les sections suivantes.

2.1. Structure de ER α et ER β

Les ERs (Estrogen receptors) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes. Les deux isoformes ER α et ER β sont des facteurs de transcription nucléaires. Leurs structure est composée de 6 régions fonctionnelles soient A/B, C, D, E et F (38). Partant du N-terminal vers le C-terminal, ces régions contiennent les domaines AF-1 (Activation Function 1), DBD (DNA binding domain), la région charnière, LBD (Ligand Binding Domain) et AF-2 (Activation Function 2) (Figure 2).

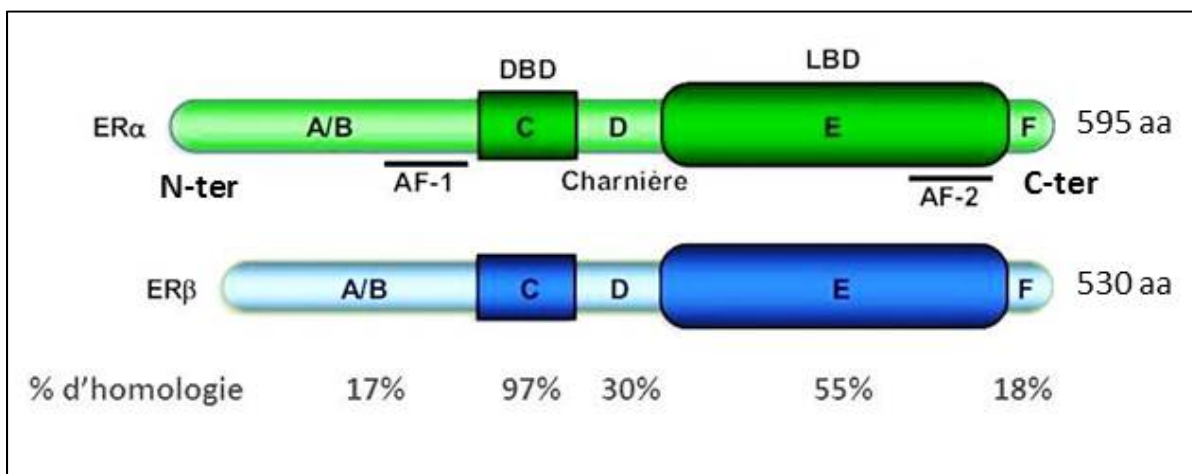


Figure 2. Structure des récepteurs aux estrogènes.

Les régions N-terminales et C-terminales des ERs (Estrogen Receptors) contiennent le domaine AF-1 (Activation Function 1) et le LBD (Ligand Binding Domain) respectivement, la région charnière se trouve dans le domaine D et enfin, la région E/F contient le domaine DBD (DNA

binding domain) et aussi le domaine AF-2 (Activation Function 2). Le pourcentage d'homologie dans chaque domaine entre les isoformes ER α et le RE β est représenté ainsi que le nombre d'acides aminés. Adapté de (39)

2.1.1. Le domaine AF-1

Comme le montre la figure 2, ce domaine AF-1 se trouve en position N-terminale et appartient à la région A/B. De plus, dans le domaines AF-1 se trouvent plusieurs acides aminés qui sont des cibles de modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation (40). AF-1 est impliqué dans l'activation du récepteur de façon hormone-indépendante et c'est un domaine qui est essentiel pour l'interaction du récepteur avec les co-régulateurs transcriptionnels qui peuvent être co-activateurs ou corépresseurs favorisant ou inhibant l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes, respectivement (41). En solution aqueuse, la région AF-1 est non structurée, c'est-à-dire que les séquences d'acides aminés possèdent une conformation intrinsèquement désordonnée (42) et c'est la phosphorylation qui donne une structure stable au domaine AF-1 (43). Un fait important à souligner qui est le pourcentage d'homologie entre les deux isoformes. Avec seulement 17% d'homologie entre les deux isoformes, AF-1 est la région la moins conservée entre les deux récepteurs, suggérant que ER α et ER β peuvent transmettre les signaux par différentes voies intracellulaires (40).

2.1.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Ce domaine se trouve dans la région C (Figure 2), et il permet la liaison du récepteur à l'ADN. Au niveau du DBD, on retrouve un motif appelé doigt de zinc. Ce motif est responsable de la dimérisation du récepteur et de la reconnaissance d'une séquence palindromique d'ADN appelée ERE (élément de réponse à l'estrogène) retrouvée dans les promoteurs des gènes cibles

(Figure 3). Le domaine DBD est le plus conservé entre les récepteurs nucléaires avec 97% d'homologie entre ER α et ER β , ce qui permet aux deux isoformes de se lier sur la même séquence au niveau des gènes cibles (44, 45).

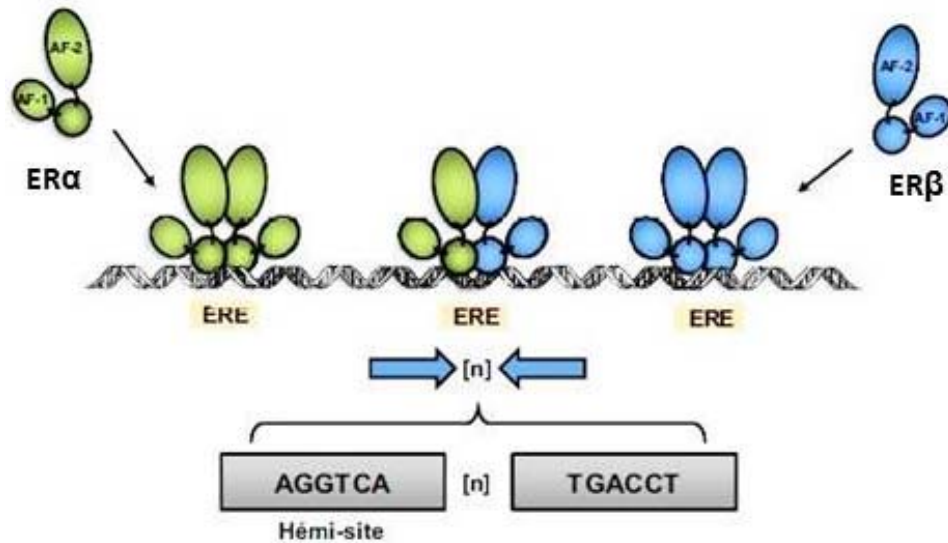


Figure 3. Éléments de réponse aux estrogènes.

Orientation des éléments de réponse et les différentes configurations de dimérisations possibles de ER. Les flèches indiquent l'orientation du demi-site et [n] qui est de 3 pour les ERs, représente de nombre d'acides aminés séparant les demi-sites.

2.1.3. La région charnière

La charnière est localisée dans le domaine D (Figure 2). C'est la structure flexible de cette région qui facilite la dimérisation de ER, l'interaction de ER avec l'ADN et la coordination entre les domaines AF (46) (Figure 3). Il a été démontré que la région charnière est responsable de la transduction du signal et de la localisation nucléaire du récepteur. La région charnière est joue un rôle important dans la régulation des ERs. Cette régulation se traduit par la présence de sites de phosphorylation, de sumoylation et d'ubiquitination qui peuvent être impliqués dans

l'activation transcriptionnelle et/ou la stabilité du récepteur (47, 48) (49). La phosphorylation, la sumoylation et l'ubiquitination sont des modifications post-traductionnelles qui consistent en l'attachement covalent d'un groupe phosphate sur les acides aminés sérine, thréonine ou tyrosine par une protéine kinase, l'attachement covalent de polypeptides ubiquitines (50) et l'attachement d'une molécule SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sur des résidus lysines spécifiques (51), respectivement.

2.1.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD)

Le LBD se trouve dans les régions (E/F) (Figure 2) et contient le domaine d'activation (AF-2). Ce domaine est caractérisé par l'existence de l'hélice- α H12 qui permet l'activation des récepteurs de façon ligand-dépendante. Dans ce cas, la liaison des estrogènes ou leurs agonistes, induit un changement conformationnel dans le LBD qui positionne l'hélice- α H12 sur la cavité liant le ligand. Cette position est une condition préalable à l'activation transcriptionnelle, car elle permet de générer une surface propice pour les interactions avec les co-activateurs, SRC-1 (Steroid receptor coactivator-1) et PBP (Peroxisome proliferator-activated receptor binding protein) (52), établissant une AF-2 dépendante du ligand (53). Inversement, les agonistes ne permettent ce positionnement de l'hélice ce qui empêche la AF-2 de s'activer (54, 55). D'autre part, le LBD interagit avec la protéine du choc thermique Hsp90. Cette dernière est connue pour réguler la transduction du signal par les récepteurs hormonaux stéroïdiens et les protéines kinases. Dans le cas des récepteurs aux estrogènes, Hsp90 s'associe aux récepteurs qui ne sont pas liés aux ligands. À la liaison des ligands, Hsp90 se dissocie conduisant à la dimérisation du récepteur, à l'interaction avec des co-activateurs et à la liaison à l'ADN (56). Finalement, le LBD est impliqué dans l'homo et l'hétérodimérisation des ERs (Figure 3). Par ailleurs, AF-2 contrôle

l'activité transcriptionnelle des ERs, mais avec 54% d'homologie dans ce domaine, les réponses cellulaires ligand-dépendantes transmises par ER α et ER β peuvent être différentes. C'est pourquoi il y a une sélectivité dans l'activité transcriptionnelle de certains gènes cibles qui sont induits ou inhibé de façon spécifique à chacun des deux isoformes ER α et ER β (57).

2.1.1. Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal se trouve dans la région F. Son rôle est peu connu, mais des études ont démontré que F est requis pour l'activation de ER α par le tamoxifène, un antioestrogène non stéroïdien (58). Le domaine C-terminal est aussi impliqué dans les modifications requises pour permettre l'interaction entre les récepteurs et les co-régulateurs (57). Entre ER α et ER β on retrouve seulement 18% d'homologie dans la région F (Figure 2), ce qui suggère un contrôle sélectif dans l'activité des récepteurs aux estrogènes (58). Plusieurs études supportent l'idée que le domaine F est en partie responsable des différences dans l'activité biologique de ER α et ER β . En effet, sur un site AP-1, la délétion de la région F de ER β rend le récepteur activé par le tamoxifène et le raloxifène comparativement au ER β de type sauvage qui n'est activé que par le raloxifène, un agoniste/antagoniste mixte de l'estrogène. D'autre part, la suppression de F de ER α le rend activé par le raloxifène tandis que ER α de type sauvage n'est plus activé par le raloxifène mais par E2 et le tamoxifène. De plus, le clonage du domaine F de ER α dans ER β ne change pas l'affinité de ER β à son ligand, alors que le clonage du domaine F de ER β dans ER α élimine l'activation du récepteur par E2 (57). Les différences entre les domaines F de ER α et ER β peuvent offrir des possibilités de contrôle sélectif de l'activité de chaque récepteur qui nous permettra de favoriser le recrutement d'un co-régulateurs en dépit d'un autre dans un contexte hormonothérapeutique.

2.2. Les Rôles biologiques des ERs

Le rôle biologique que jouent les ERs dans l'organisme dépend principalement de deux facteurs, la distribution tissulaire des ERs et les différences structurelles entre les deux isoformes. Chez les mammifères, le niveau d'expression de ER α et ER β varie d'un organe à un autre. Alors que certains organes démontrent une co-expression de ER α et ER β , d'autres organes n'expriment que l'un ou l'autre des deux isoformes (Figure 4). Il est également connu que certains changements dues à la puberté, la période préménopause et en post-ménopause qui affectant la production endogène de l'estrogène, peuvent influencer l'expression tissu-spécifique d'ER α et d'ER β (59). ER α et ER β ont des fonctions biologiques différentes qui sont présentés dans les sections suivantes. Ces différences ont été démontrées par l'élimination de l'expression de l'un ou l'autre isoforme, ce qui entraîne des phénotypes distincts chez la souris. Par ailleurs, l'analyse des rôles de ER α et ER β en utilisant des modèles de souris KO (knock-out) a démontré les différents impacts de la signalisation des ERs (60, 61).

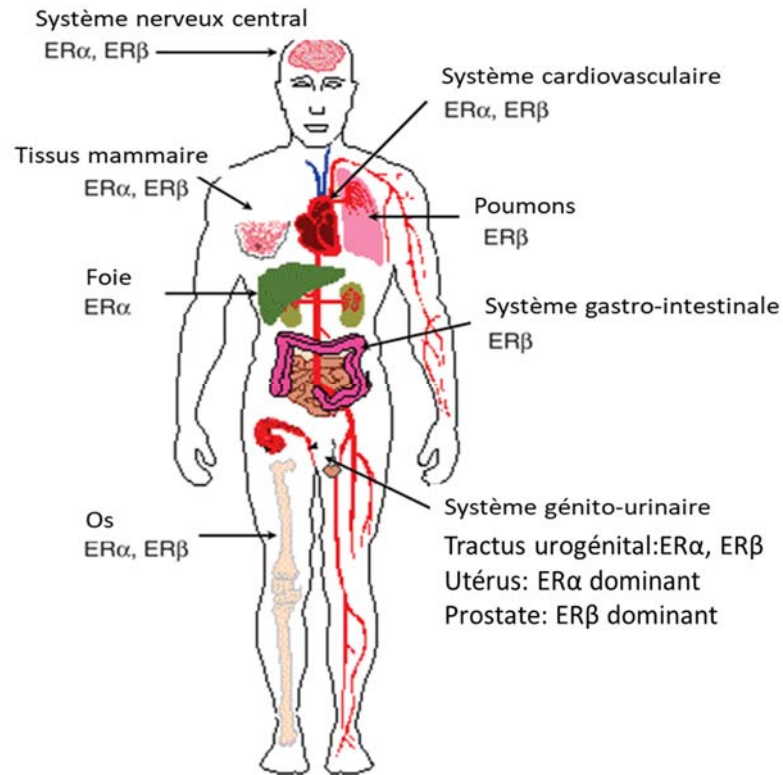


Figure 4. Distribution tissulaire de ER dans l'organisme.

Certains tissus co-expriment ER α et ER β alors que d'autres se limitent à l'un ou l'autre des deux isoformes. Adaptée de (62)

2.2.1. Rôle dans le système reproducteur

Dans le but d'évaluer le rôle physiologique de chacun des isoformes, des souris KO (Knock-Out) en ER α ou ER β et des souris KO en ER α et ER β , ont été générées (63). Les nombreuses expériences menées sur ces modèles, ont élucidé la fonction des ERs dans des conditions pathologiques spécifiques à l'absence d'expression des ERs (64, 65). Les souris ER α KO mâles et femelles sont infertiles, tandis que la fertilité diffère entre les souris ER β KO

selon le sexe. Les souris ER β KO femelles ont une fertilité réduite expliquée par une dysfonction ovulatoire car ces souris présentent un phénotype de cellule granulosa associé à l'arrêt partiel de la folliculogenèse ovarienne (66). En revanche, chez les souris mâles ER β KO, la fertilité reste normale en raison d'une production suffisante de spermatozoïdes permettant le maintien de fertilité .

L'infertilité chez les souris femelles ER α KO est due à un défaut de réponse aux estrogènes dans l'utérus (67). Les souris femelles ER α KO possèdent un nombre réduit de glandes dans l'endomètre, alors que les souris ER β KO femelles ont des tissus utérins et vaginaux normaux malgré leur fertilité réduite. Une autre raison de l'infertilité chez les souris KO est la fonction ovarienne anormale. Un phénotype ovarien anormal provoque l'infertilité chez les souris ER α KO et réduit la fertilité chez les souris ER β KO. Les souris ER α KO semblent être incapables d'ovuler, et les souris ER β KO démontrent une dérégulation dans l'ovulation par augmentation de follicules non rompus, et une réduction dans le nombre d'ovocytes (66). Les souris doubles déficientes pour le ER α et ER β présentent le même phénotype que pour les souris ER α KO quant à la viabilité et l'infertilité. Elles présentent un développement normal des caractères reproducteurs chez le mâle mais déficient chez la femelle tout comme les souris invalidées en ER α (68).

2.2.2. Rôle dans l'os

Bien que ER α soit exprimé à de faibles niveaux dans l'os, les souris ER α KO mâles et femelles, démontrent une diminution significative dans la densité osseuse (69). Les souris ER β KO sont phénotypiquement identiques aux souris de type sauvage (70). Ceci suggère un rôle essentiel de ER α dans la maturation et l'intégrité osseuse. En effet, l'estrogène est essentiel

à l'homéostasie osseuse (71, 72) par le contrôle de l'expression des gènes dans les cellules osseuses, y compris les ostéoblastes, les ostéoclastes et les ostéocytes (73). IGF-1 (insulin-like growth factor 1) est un facteur de croissance d'une importance majeure pour le développement squelettique des vertébrés (74). Lors de la résorption osseuse, des quantités significatives d'IGF sont libérées créant un microenvironnement ostéogénique induisant la différenciation des cellules mésenchymateuses recrutés et liant étroitement la résorption osseuse à la formation (75, 76). L'estrogène est connu pour stimuler la libération des facteurs de croissance tels que IGF-1 qui influencent la résorption osseuse conférant un rôle de l'estrogène dans la résorption osseuse (77). C'est pourquoi des agonistes de l'estrogène E2, tamoxifène, raloxifène, lasofoxifène et bazédoxifène (78-81) sont souvent prescrits chez les femmes ménopausées qui sont plus à risque de fracture (82). De plus, ce sont les estrogènes qui causent la maturation de la plaque de croissance épiphysaire et la fermeture des épiphyses en fin de puberté. Les hommes déficients en aromatase (*CYP19A1*) ou en ER-alpha (*ERS1*) ont des épiphyses toujours ouvertes et continuent à grandir après la fin de leur puberté (83-85).

2.2.3. Rôle dans le système cardio-vasculaire

Au niveau du système cardiovasculaire, le rôle cardio-protecteur de E2 a été attribué à ER α et non à ER β tel que démontré par les modèles de souris ERKO. Effectivement, Les souris ERKO développent une maladie intrinsèquement vasculaire (86) et les souris déficientes en ER α développent une hypertension systolique et diastolique soutenue en vieillissant (87).

Les ERs sont exprimés dans les cellules musculaires endothéliales et lisses des tissus vasculaires, ce qui suggère que la signalisation des ERs soit impliquée dans les fonctions des cellules musculaires lisses. De plus, diverses études ont récemment démontré que l'estrogène

affecte la structure des vaisseaux sanguins (88, 89). Les particules de LDL sont associées à l'athérosclérose coronarienne (90-92) et les petites particules LDL denses ont des propriétés athérogènes, telles que la liaison accrue aux protéoglycanes des parois artérielles, une faible affinité pour le récepteur des LDL et une susceptibilité accrue à l'oxydation (93). En fait, l'estrogène exerce un effet cardioprotecteur en réduisant les taux des LDL dans la circulation (94).

2.2.4. Rôle dans le système nerveux central

L'estrogène joue un rôle primordial dans la formation des synapses (95), la régulation de la croissance et de la différenciation des axones et des dendrites, et les fonctions cognitives comportementales (96). De plus, la signalisation des estrogènes contribue à l'intégrité du cerveau et exerce différents effets sur le comportement (97). Les études menées sur des souris ERKO, montrent que la fonction de ER α semble être importante pour la reproduction car il est essentiel pour la maturation utérine. Dans ce cas, l'estrogène régule des gènes impliqués dans les différentes phases de croissance et de maturation de l'utérine, soient la phase de l'imbibition de l'eau dans l'endothélium stromal, la phase de la prolifération cellulaire synchrone et la des changements cytoarchitecturaux associés à la différenciation des cellules épithéliales luminales (98). En revanche, ER β peut affecter les processus cognitifs (89, 99, 100). Les études sur les souris ER β KO attribuent à cet isoforme un rôle important dans le développement morphologique adéquat du cerveau et aussi dans la migration et la survie neuronale (101, 102).

Certaines études relient ER β au comportement émotionnel du fait que les souris déficientes en ER β démontrent une augmentation de l'anxiété (103). De plus, l'interaction des

ERs avec l'estrogène réduit la génération neuronale des peptides bêta-amyloïdes diminuant ainsi le risque à la maladie d'Alzheimer (27).

2.3. Redondance entre ER α et ER β

La différence dans la distribution tissulaire de ER α et ER β pouvait expliquer l'effet spécifique de l'estrogène dans chaque tissu. Cependant, d'autres études ont pu octroyer la spécificité tissulaire au type de l'hétérodimère formé par les isoformes. Effectivement, il a été démontré que si les deux isoformes sont coexprimés, ils formeront un hétérodimère qui lie ERE (Figure 3) avec la même affinité que s'il s'agissait de l'homodimère ER α (104-106). Ce qui a mené à la conclusion que la régulation de certains gènes n'est faite que par l'hétérodimère ER α /ER β . Ainsi, l'expression des gènes en réponse à l'estrogène est une conséquence du ratio d'expression des ERs. Un exemple du profil d'expression génique a été réalisé au niveau des cellules cancéreuses du sein de type MCF-7 en réponse à l'estrogène. L'étude a démontré que parmi les 921 gènes régulés, ER β semble interférer avec l'activité transcriptionnelle de ER α en modulant les effets de ER α sur la transcription génique et la prolifération cellulaire (107), et ce en activant ou en inhibant l'action de ER α sur 171 gènes cibles de ER α en permettant la régulation de 516 gènes (108). Les gènes régulés par les ERs sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire ainsi que la transduction de signaux cellulaires (109).

2.4. Mécanismes de signalisation des récepteurs aux estrogènes

Dans la signalisation des récepteurs aux estrogènes, on peut distinguer deux grandes voies, génomique pour réguler l'expression des gènes cibles et non-génomique qui active des cascades de signalisation. De plus, la liaison du complexe E2-ER à l'ADN peut être directe ou indirecte. Les différents mécanismes de signalisation des estrogènes sont représentés dans la figure 5.

2.4.1. Signalisation génomique directe ERE-dépendante

La voie de signalisation génomique directe est considérée comme le mécanisme classique de la signalisation des estrogènes. À la liaison de E2, ER α ou ER β est activé et se détache de Hsp90 dans le cytoplasme, se dimérise et subit une translocation au noyau où il sera recruté au niveau des EREs situés dans promoteurs des gènes cibles (Figure 5A). C'est grâce à son DBD que les ERs lient l'ADN au niveau de ERE, une séquence spécifique d'ADN, qui doit être une séquence palindromique parfaite et inversée (Figure 3). Au niveau du génome humain, on retrouve environ 60 000 EREs dont la plupart sont imparfaits et non palindromiques (110). De ce fait, les ERs modulent la transcription des gènes cibles en se liant aux ERE qui sont parfaits (111). Les ERE peuvent être situés dans le promoteur proximal, c'est-à-dire à environ 250 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, ou bien dans le promoteur distal pouvant contenir des régulateurs supplémentaires à la transcription d'un gène cible.

La liaison du ligand au récepteur déclenche également le recrutement d'une variété de corégulateurs dans un complexe qui modifie la structure de la chromatine et facilite le

recrutement de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II. De cette manière, le complexe E2-ER agit comme un activateur transcriptionnel favorisant l'expression génique (112).

2.4.2. Signalisation génomique indirecte ERE-indépendante

Les ERs ont la capacité de réguler une gamme de gènes n'hébergeant pas de ERE dans leurs promoteurs, il s'agit d'un tiers des gènes cibles des ERs qui sont régulés de manière ERE-indépendante. Dans ce cas-là, les ERs activés par un ligand, ne se lient pas directement à l'ADN, mais ils vont moduler l'expression des gènes en interagissant avec d'autres facteurs de transcription tel que AP-1(activator protein 1), sp1 (Specificity protein 1) et NF-kB (Nuclear factor kappa B). Par exemple, indépendamment de ERE, l'activation du promoteur *CCND1* (Cycline D1) par les estrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires humaines, est médiée par le recrutement du complexe c-Jun/c-Fos/ER au niveau du facteur de transcription AP-1 (Activator protein 1) (113, 114) (115) (Figure 5B).

2.4.3. Signalisation indépendante du ligand

Les ERs peuvent également être activés en l'absence de E2 ou d'un autre ligand approprié. La phosphorylation des récepteurs sur certains résidus, tel que la phosphorylation de la sérine 118 de ER α (116) ou la sérine 87 de ER β (117) ou encore la phosphorylation des corégulateurs associés aux ERs, peut provoquer une activation ER-indépendante du ligand. Le mécanisme d'activation des ERs par phosphorylation a été mis en évidence en 1990 suite à l'administration d'EGF (Epidermal Growth Factor) ou TGF- β (Transforming Growth Factor beta) à des souris ovariectomisées. Ce traitement provoquait des effets similaires à l'estrogène

(118). La phosphorylation est entre autre induite par des facteurs de croissance peptidiques qui en interagissant avec leurs récepteurs à la membrane, montrent une activité tyrosine kinase phosphorylant les substrats sur les résidus sérine et thréonine (119), des cytokines tel que TNF α (120), des neurotransmetteurs tel que la dopamine (121), l'héréguline ou l'interleukine 2 (35). Ces derniers conduisent à l'activation des voies de signalisation des kinases, telles que Erk1/2 et p38, PI3K/Akt, PKA et PKC. Erk1/2 réagit principalement aux facteurs de croissance et aux mitogènes pour induire la croissance et la différenciation cellulaires (122). Tandis que p38 est fortement activé par les stress environnementaux et les cytokines inflammatoires (123). PI3K est un effecteur en aval des récepteurs tyrosines kianes (RTK) qui transforme les signaux des différents facteurs de croissance et cytokines en messages intracellulaires pour générer des phospholipides activent la sérine / thréonine kinase AKT (124). PKA (Protein kinase A) et PKC sont des sérine/thréonine kinase activée par l'AMPc et par le Ca²⁺ respectivement (125, 126). Ces kinases vont phosphoryler directement les ERs au niveau de l'AF-1, provoquer leur translocation nucléaire et leurs interactions avec l'ADN (Figure 5C) (127).

2.4.4. Signalisation non-génomique

La signalisation d'estrogène non génomique (Figure 5D) est médiée par les récepteurs aux estrogènes liés à la membrane, tel que GPER1 et certaines variantes de ER α et ER β . Cette signalisation est trop rapide pour induire la transcription des gènes cibles. Toutefois, Les actions non génomiques peuvent être associées à l'activation de diverses cascades de protéines-kinases qui peuvent éventuellement conduire à des changements indirects dans l'expression des gènes en raison de la phosphorylation des facteurs de transcription. Suite à la liaison de E2 aux récepteurs d'estrogène membranaires, plusieurs cascades de signalisations sont activées

incluant, la mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase et la production de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), l'activation de la voie des MAPK et l'activation du phosphoinositol (128, 129)

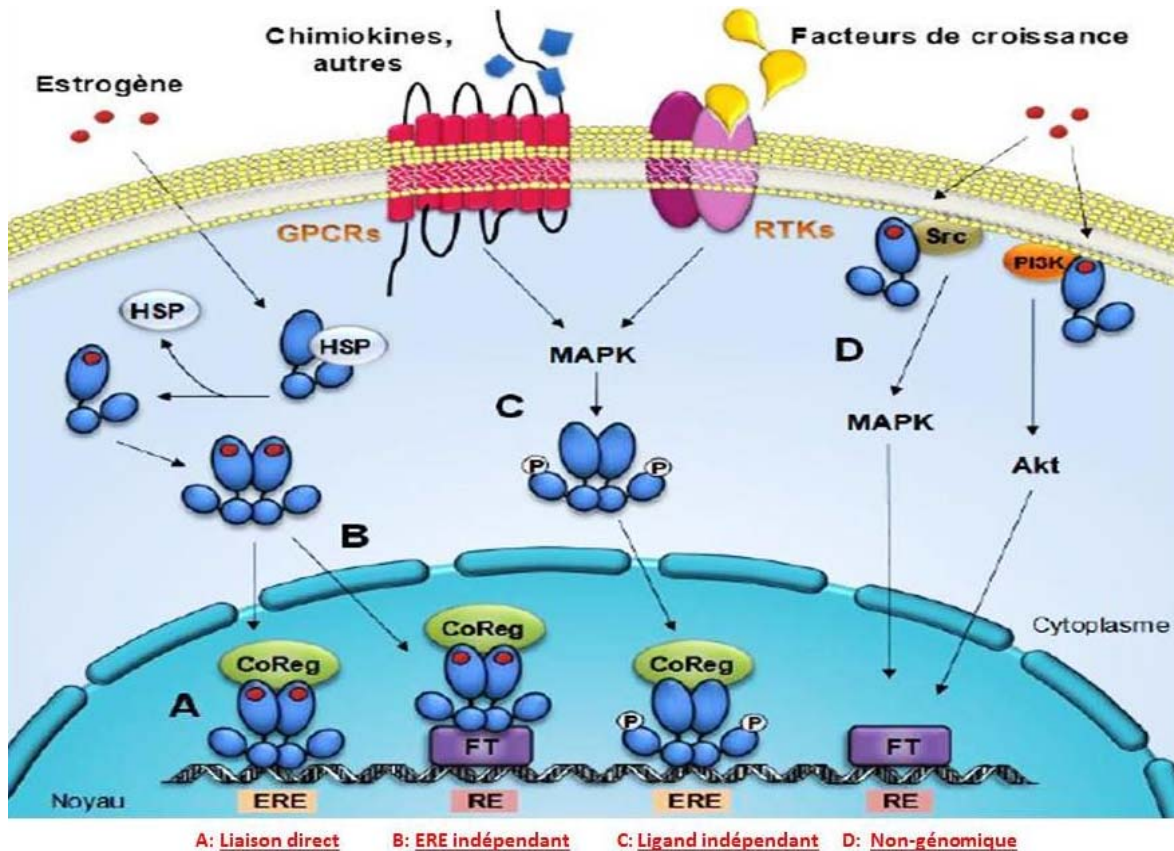


Figure 5. Les différents mécanismes d'actions des récepteurs aux estrogènes.

Les récepteurs des estrogènes s'activent par la voie classique (A), ERE-indépendante (B), de façon ligand-indépendante suite à la phosphorylation par les MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et enfin de façon non génomique (D). Adaptée de (130)

2.5. L'activation transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes

L'estrogène peut activer ou réprimer la transcription des gènes cibles des ERs par le recrutement de corégulateurs qui agissent en remodelant la chromatine. Les corégulateurs qui favorisent l'activité transcriptionnelle des ERs sont appelés coactivateurs. Ces derniers sont recrutés au niveau des gènes cibles et la chromatine à cette région est remodelée par la modification des histones, facilitant la transcription médiée par l'ARN polymérase II. À l'opposé, les corépresseurs sont des corégulateurs qui répriment l'activité transcriptionnelle des ERs. Dans ce cas, l'interaction de ces corépresseurs provoque le recrutement des histone désacétylases (HDAC) au niveau du gène cible pour maintenir la chromatine dans une conformation fermée et inaccessible à l'ARN polymérase II, conduisant ainsi à une inhibition transcriptionnelle du gène cible (131, 132) (Figure 6).

2.5.1. Les coactivateurs

Les coactivateurs transcriptionnels sont incapables de lier directement l'ADN, mais par contre, ils lient les facteurs de transcription. L'effet des coactivateurs c'est d'augmenter l'expression génique en modulant positivement l'activité transcriptionnelle des ERs. Pour initier la transcription, il faut d'abord que les promoteurs soient accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Pour ce faire, les coactivateurs recrutés vont induire divers changements conformationnels comme la décondensation de la chromatine favorisée entre autre par PRMT1 (Protein Arginine Methyl Transferase 1) et CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyl Transferase 1) (Figure 6) (133). L'interaction de PRMT1 et CARM1 avec ER passe par leur

recrutement par d'autres coactivateurs comme SRC (Steroid receptor coactivator) et CBP/p300 (CREB-binding protein) (Figure 6). Les SRC sont importants pour la régulation des ERs, ils possèdent plusieurs domaines d'interaction, un domaine qui contient le motif LXXLL (L: Leucine, x: n'importe quel acide aminé) qui leur permet d'interagir avec ER via le domaine AF-2, un domaine AD1 qui permet le recrutement de CBP/p300 et un domaine AD2 qui interagit avec PRMT1 et CARM1 (134-136). Il existe trois isoformes de SRC (SRC-1, SRC-2 et SRC-3). La surexpression des SRC dans les tissus malins comparativement aux tissus sains laisse croire que les SRC ont un rôle dans le développement du cancer (137) ainsi que dans la résistance aux traitements anti-estrogéniques du cancer du sein (138). Bien que ER α et ER β semblent similaires pour le recrutement des coactivateurs à motif LXXLL, des études ont démontré que le recrutement de certains coactivateurs comme TRAP220 (Thyroid receptor-associated protein complex 220 kDa), dépend de la spécificité de la liaison du domaine F de chaque isoforme avec le motif LXXLL du coactivateur en question (58). TRAP220 est connu pour interagir avec un autre coactivateur. En effet, TRAP220 se trouve dans le même complexe avec DRIP205 (Vitamin D-interacting Protein 205) et ensemble, ils agissent comme régulateurs positifs de l'activation transcriptionnelle ligand-dépendant des ERs (139)

2.5.2. Les corépresseurs

À l'inverse des coactivateurs, les corépresseurs favorisent la répression génique. Ils confèrent un mécanisme cellulaire pour restreindre la réponse hormonale. Des études cliniques ont montré que la perte des corépresseurs peut être à l'origine du développement de plusieurs types de cancers, ainsi qu'à la résistance à l'hormonothérapie (140). Les corépresseurs sont recrutés par ER suite à l'action des antagonistes dans le but d'inhiber l'activité de ER (141).

Tout comme les coactivateurs, les corépresseurs ne lient pas directement l'ADN, ils sont recrutés par ER et ce grâce à leur domaine LXXLL. Certains corépresseurs comme RIP140 (Receptor Interacting Protein 140), N-CoR (Nuclear Hormone Corepressor) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic and thyroid hormone Receptors) (en rouge dans la figure 6) sont spécifique à ER α ou ER β en fonction du ligand. Par exemple, en présence du tamoxifène, ER α recrute N-CoR tandis que SMRT est recruté par ER β (142). Les corepresseurs interagissent avec AF-2 de ER en entrant en compétition avec les coactivateurs et recrutent à leur tour un autre corépresseur comme ceux de la famille des HDAC pour empêcher la liaison du coactivateur SRC-1 (132).

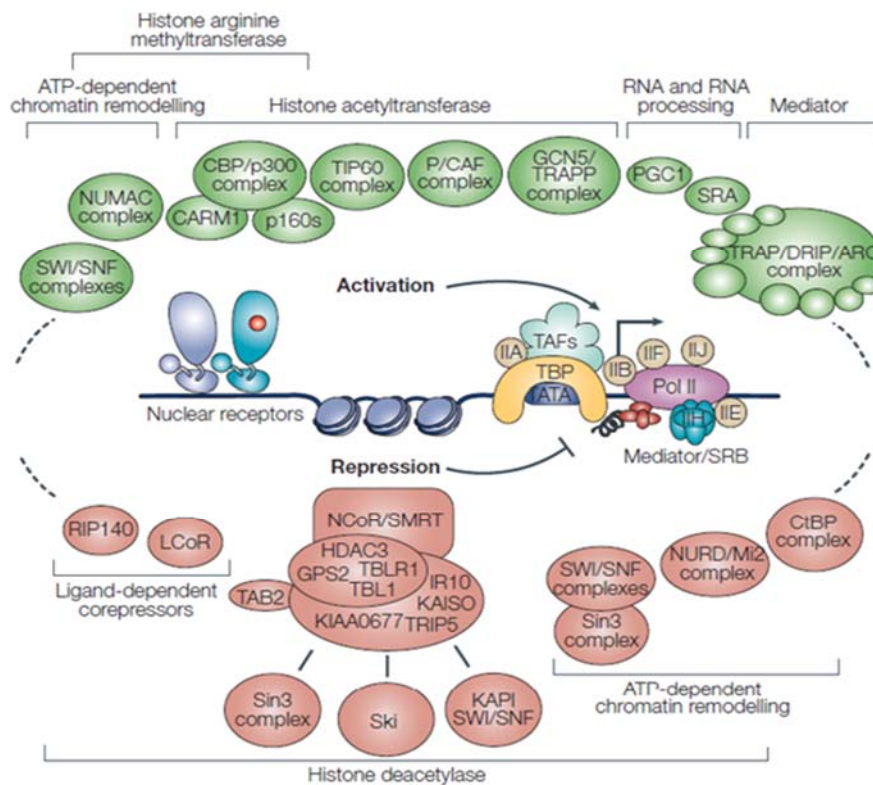


Figure 6. Les co-régulateurs transcriptionnels des ERs.

Schéma des différents coactivateurs (en vert) et corépresseurs (en rouge) impliqués dans l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes. Adaptée de (135)

2.6. Modulation de l'activité des récepteurs aux estrogènes

La modulation de l'activité des ERs se fait principalement par les modifications post-traductionnelles (MPT). On compte plusieurs MPT, notamment la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'acétylation, la méthylation, la palmitoylation et la glycosylation.

Ces MPT sont impliquées dans divers processus de régulation, comme la localisation cellulaire, la stabilité et la conformation des ERs, leurs sensibilités envers le ligand, leurs interactions avec l'ADN et aussi dans le recrutement de leurs cofacteurs (40, 130). La régulation de ER α par les MPT est beaucoup plus caractérisée que celle de l'isoforme ER β et jusqu'à maintenant on en a répertorié près de 22 sites ciblés par les MPT pour ER α (53).

En absence du ligand, l'ubiquitination de ER α au niveau des lysines présentent dans le LBD engendre la dégradation du récepteur. Bien que l'ubiquitination de ER α affecte son activité transcriptionnelle et engendre sa dégradation, ceci va permettre de libérer les promoteurs et de mettre en place de nouvelles rondes de transcription. Il a été démontré que la monoubiquitination initie l'activité transcriptionnelle de ER α (143). Notre laboratoire a démontré que l'ubiquitination de ER β a lieu suite à la phosphorylation de la sérine-94 et la sérine-106 et que l'activité du récepteur est améliorée quand ces deux sérines sont phosphorylées (144).

Bien que ER α et ER β ne possèdent pas de site accepteur consensus pour SUMO (145), ER α peut être sumoylé dans la région charnière par SUMO-1 sur 5 lysines K266, K268, K299, K302 et K303 et cette sumoylation augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur (48). D'autre part, en présence de E2, ER β est sumoylé sur la lysine 4, et cette sumoylation est

maximisée par la phosphorylation d'une sérine adjacente tel que démontré par notre laboratoire. L'impact de cette sumoylation sur ER β se traduit par une diminution dans l'activité transcriptionnelle du récepteur (144).

CREB/p300 engendre l'acétylation de ER α au niveau des lysines 266 et 268, 299, 302 et 302 (146). Alors que l'acétylation des lysines 299, 302 et 303 inhibe l'activité transcriptionnelle de ER α , l'acétylation du récepteur au niveau des lysines 266 et 268 favorise son activité (48).

La lysine methyltransférase SET7 médie la monométhylation de ER α sur la lysine 302 engendrant la stabilité du récepteur et facilitant le recrutement de ER α aux promoteurs des gènes cibles (147). La N-methyltransférase (PRMT1) aussi méthyle ER α au niveau de l'arginine 260 localisé dans le DBD (148). Cette méthylation régule les fonctions extranucléaires du récepteur tel que son interaction avec p85 et SRC (130).

Alors que la palmitoylation de ER α sur la cystéine 447 est catalysée par la palmitoyl acetyltransférase (PAT) (149), il se trouve que la dé-palmitoylation du récepteur soit facilité par E2, des flavonoïdes ou les modulateurs de ER α . Il se trouve que la dé-palmitoylation régule la localisation, la dimérisation et l'association du récepteur avec d'autres protéines de signalisation (149).

Grâce aux études récentes qui visent la caractérisation des sites de régulation de ER β , il a été démontré que les MPT font diverger les fonctions de chaque isoforme. La phosphorylation permet de soulever les différences fonctionnelles dans l'activité transcriptionnelle entre ER α et ER β , principalement au niveau du domaine le moins conservé entre les ERs, soit le domaine AF-1. (40)

2.6.1. La phosphorylation des ERs

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée, elle est impliquée dans plusieurs processus de régulations cellulaires. La phosphorylation rend les signaux extracellulaires spécifiques à une réponse cellulaire interne et joue un rôle important dans différents processus dont la transcription, le métabolisme, le maintien du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette et aussi dans l'apoptose et la différenciation cellulaire (150).

La phosphorylation des ERs se fait principalement sur des résidus sérines ou thréonine faisant partie d'un motif Ser/Thr-Pro au niveau du domaine AF-1 suite, principalement, à l'activation des MAPKs. On ne retrouve qu'un seul site de phosphorylation conservé entre les deux isoformes (151), c'est donc au niveau des autres sites non conservés que se distingue l'activité AF-1 de chaque ER.

2.6.1.1. Phosphorylation de ER α

Il existe plusieurs sites de phosphorylation du récepteur ER α présents sur les différents domaines du récepteur, mais surtout dans la région N-terminale. Ces sites sont principalement des résidus de sérines, mais il peut aussi s'agir de phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine, tel que montré à la figure 7.

Un des sites les plus caractérisés de ER α est la serine 118 (S118). La S118 a été le site le plus étudié et constitue un bon exemple de la complexité de la phosphorylation de ER α . La phosphorylation sur cette sérine est importante pour la liaison directe et aussi pour l'activation ou la répression de plusieurs gènes cibles de ER α (152). Les facteurs de croissance EGF et IGF-1 entraînent la phosphorylation de la sérine 118 (pS118) à travers les cascades Ras-MAPK (153,

154). De plus, les interactions de ER α avec les coactivateurs tels que CREB/p300 (155) ou SRC-1 (156) sont facilités par la phosphorylation de S118. La phosphorylation de S118 favorise l'activation de ER α dépendamment et indépendamment du ligand. Ceci avait été démontré par l'utilisation du mutant S118A. Les cellules transfectées avec ce mutant et traitées avec EGF, n'avaient démontrés aucune amélioration de l'activité du rapporteur de ERE induite par E2 (157). MAPK, IKK α , GSK-3, CDK7, mTOR/p70S6K (158) sont impliqués dans les cascades menant à la phosphorylation de S118. La prolactine (PRL), une hormone polypeptidique produite par les lactotropes de la glande pituitaire antérieure et dans les tumeurs normales et mammaires, exerce ses diverses fonctions par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques (159). Plus récemment, il a été démontré que la prolactine induit la phosphorylation de S118 via l'activation des kinases PIK3/MEK/ERK (160).

La phosphorylation de ER α au niveau de la sérine-118 est impliquée dans l'activation de ER α entraînant la régulation de gènes cibles (154). C'est pourquoi l'activation persistante indépendante du ligand de ER α via la phosphorylation de la sérine-118 pourrait être associée à la résistance au tamoxifène dans le traitement du cancer du sein (161, 162).

ER α peut aussi être phosphorylé au niveau de la Sérine-167 en réponse à EGF en plus des kinases Akt et S6K1 (163). La phosphorylation de la sérine-167 active et stabilise le récepteur et, en plus de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses du sein, la phosphorylation de ce résidu est responsable en partie de la résistance au tamoxifène (156). D'autres sérines sont ciblées par les facteurs de croissance soient la S104 et S106 qui sont phosphorylées par Erk1/2 en réponse à E2 et d'autres kinases comme Src (164, 165). La transactivation de ER α suite à la phosphorylation des deux sérines S104 et S106, permettra l'action agoniste du tamoxifène (166). Il est connu que les GPCR (Récepteur couplé aux

protéines G) activent la PKA (Protéine kinase A), cette kinase régule les sérines 236 et 305 qui vont à leur tour exercer leurs effets sur ER α . La S236 stabilise et protège ER α contre la dégradation (116, 167). La S305 favorise sa dimérisation et sa liaison à l'ADN en plus de favoriser l'action du tamoxifène par le recrutement de SRC-1 (168, 169).

2.6.1.2. Phosphorylation de ER β

Les sites potentiels à la phosphorylation sur ER β sont montrés à la figure 7. Les sérines 106 et 124 sont phosphorylées suite à l'induction des MAPKs et Erk1/2 par EGF. L'action activatrice de la phosphorylation de S106 et S124 réside dans le recrutement de SRC-1 et CBP (106, 170), aussi, en concert avec la S94, la S106 favorise la stabilité et la mobilité de ER β (171). En contre parti, la dégradation du récepteur est favorisée par la phosphorylation de la sérine 255 en réponse à la voie PI3K/Akt activée par ErbB2/ErbB3. La Ser-255 induit l'ubiquitination de ER β déjà présent dans un complexe avec CBP et E3-ubiquitine ligase Mdm2 (172).

Notre laboratoire a récemment identifié la sérine 87 comme étant une cible de phosphorylation par les MAPKs. L'activation du récepteur membranaire CXCR4 par son ligand la chimiokine SDF-1/CXCL12, mène à la phosphorylation de la sérine 87, et ce en présence ou en absence de l'estrogène. Une fois phosphorylée, l'activité transcriptionnelle de ER β est amplifiée conduisant à l'augmentation dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (117).

La sérine-60 est particulièrement importante car elle est impliquée dans le processus de la dégradation de ER β . Ce résidu est situé dans une région qui constitue un signal pour la dégradation par le protéasome. Une fois phosphorylée, la pS60 mène à la dégradation de même

que l'activation du récepteur (173). Effectivement, la S60 qui peut être le siège d'une glycosylation pour le récepteur, et à l'encontre de la phosphorylation, la glycosylation stabilise ER β et diminue son activité transcriptionnelle (174).

Par ailleurs, tel que démontré par notre laboratoire, ER β peut également être phosphorylé au niveau des sérines 6, 8 et 12 par l'action de GSK-3 β , ce qui favorisera la sumoylation du récepteur et par conséquent le protège contre la dégradation par l'ubiquitination (144).

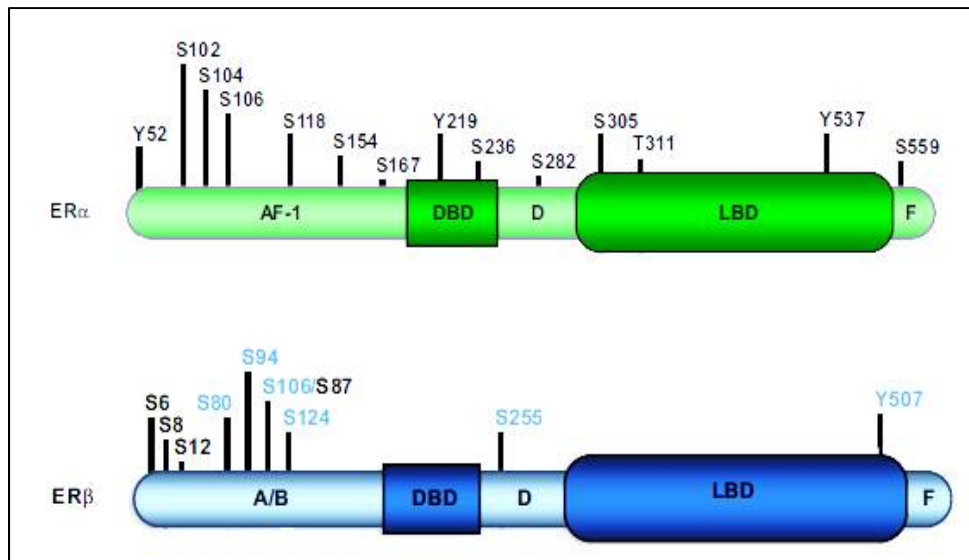


Figure 7. Représentation des différents sites de phosphorylation sur les ERs.

Les sites de phosphorylation en noir sont ceux identifiés chez l'humain, en bleu sont les sites identifiés chez la souris, murin. Adaptée de (40)

2.7. Les implications pathologiques de la signalisation des récepteurs aux estrogènes

Compte tenu de la large implication des ERs dans les différents processus physiologiques tels que son influence sur les systèmes nerveux et cardiovasculaire, la reproduction et l'intégrité osseuse, plusieurs pathologies sont associées à une dérégulation de la réponse estrogénique. Il ne serait donc pas étonnant que la surexpression ou encore la diminution des estrogènes et leur récepteurs soient à l'origine de plusieurs pathologies comprenant, entre autres, différents types de cancer, les maladies cardio-vasculaires, la neurodégénérescence et les maladies métaboliques comme la résistance à l'insuline et l'obésité (175).

2.7.1. Rôle des ERs dans le cancer du sein

Certains cancers hormono-dépendants partagent le même mécanisme qui repose sur la prolifération cellulaire induite par l'hormone dans les tissus qui sont sensibles à l'hormone comme dans le cancer du sein (176). En effet, beaucoup d'études ont démontré le risque accru de développer le cancer du sein chez les femmes post-ménopausées qui suivent une thérapie de remplacement par estrogène (177-179). L'action tumorale des estrogènes dans le tissu mammaire passe principalement par ER α . Il existe une corrélation positive de ER α dans le cancer du sein. En effet, ER α est associé au bon pronostic puisque les tumeurs ER α + peuvent être traitées avec les anti-estrogènes (180). Étant un facteur de transcription, ER α a aussi la possibilité de réguler certains gènes cibles comme le LRP16 (leukemia related protein 16) dont l'expression est liée à la croissance tumorale et au potentiel métastatique (181-185), Myc un facteur de transcription oncogénique, cycline D un régulateur important de la progression du

cycle cellulaire, ou encore Wnt11 un régulateur positif de la voie de signalisation Wnt, qui joue un rôle crucial dans la cancérogenèse (186, 187). Compte tenu des rôles de LRP16, Myc, Cyclin D et Wnt11, la régulation de leur expression par ER α a pour effet d'interférer avec les cadhérines, stimuler le cycle cellulaire, favoriser le passage de G1 à S et altérer l'apoptose, respectivement. L'ensemble de ces interférences conduiront à la prolifération cellulaire accrue et incontrôlée où la division cellulaire peut provoquer des erreurs dans la réplication de l'ADN, pour ainsi donner naissance à de nombreuses mutations favorisant le cancer (188-190). L'implication directe de ER α dans le développement et la progression tumorale lui confère un rôle de cible thérapeutique dans le traitement du cancer de sein. En effet, pour contrer l'action de ER, des antagonistes ont été développés dans le but de contrer l'interaction du récepteur avec l'estrogène à l'origine de son activation. En particulier, le tamoxifène et l'antagoniste complet l'ICI 182,780 (Fulvestrant). Toutefois, les traitements au tamoxifène ne sont jamais définitifs chez les patientes ER α positives à cause de la résistance qui survient chez 30-40% d'entre elles. Parmi les mécanismes proposés, on croit que cette résistance peut être due à plusieurs mécanismes soit à l'activité ligand-indépendante de ER en réponse aux voies de signalisation des protéines kinases, à l'action de E2 indépendamment de ER où E2 génère des métabolites génotoxiques, ou encore à la présence de ER β (191-193). Le traitement alternatif au tamoxifène est celui utilisant l'antagoniste ICI 182,780 dont l'action mène à la dégradation de ER α , mais malheureusement des cas de résistance ont été récemment rapportés. Les inhibiteurs de l'aromatase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse des estrogènes, sont aussi utilisés comme traitement du cancer du sein (194).

Concernant l'isoforme ER β , son rôle dans le développement et la progression du cancer reste encore incertain. En effet, les tentatives pour attribuer une valeur clinique à la présence de

ER β au niveau des tumeurs mammaires se sont avérées infructueuses. Cependant, certaines études ont attribué un rôle de suppresseur tumoral à ER β . En effet, dans les cas de surexpression de ER α , la suppression de ER β est souvent une caractéristique de la carcinogenèse du tissu mammaire, ce qui associe la perte de l'expression de ER β au développement du cancer (195). *In vitro*, l'expression de ER β confère un effet antiprolifératif et augmente l'expression de cycline D, MYC et p53 un facteur de transcription nucléaire responsable de l'activation de nombreux gènes cibles impliqués dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et/ou de l'apoptose (196-199), ce qui a pour effet d'arrêter le cycle cellulaire dans la phase G1 (200, 201). Parmi les mécanismes suggérés dans le but de caractériser l'action de ce récepteur, certains proposent que ER β soit capable de réprimer l'activité transcriptionnelle de ER α ainsi que la transcription des gènes cibles de ER α (202). De ce fait, de plus amples études caractérisant le rôle de ER β aideront à mieux cerner l'implication ou non de ER β dans le développement du cancer du sein.

2.7.2. Rôle des ERs dans le cancer épithélial de l'ovaire

De tous les cancers gynécologiques, le cancer épithélial de l'ovaire est la principale cause de mortalité chez les femmes. En raison du manque de méthodes de dépistage efficaces, 70% des cas sont diagnostiqués à un stade avancé avec un faible pronostic dont seulement 30% pourront vivre 5 ans (203). Les changements hormonaux chez la femme ménopausée augmentent la prévalence du cancer épithélial de l'ovaire. En effet, durant la ménopause, on assiste à une diminution du niveau d'estrogène et de la progestérone accompagnée d'une augmentation des niveaux des gonadotrophines LH (Luteinising hormone) et FSH (Follicular stimulating hormone). Le rôle des ERs est bien étudié dans le cancer du sein. Cependant, très peu est connu sur l'implication des ERs au niveau du cancer de l'ovaire.

La plus grande étude examinant l'expression de ER α dans les cancers ovariens comprenait 2933 patientes atteintes du cancer des ovaires avec diverses histologies épithéliales (204). Dans cette cohorte, 1742 patients avaient des carcinomes de type séreux où ER α étaient présents chez 81% des patients. Grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*, la présence des récepteurs aux estrogènes dans le cancer des ovaires ainsi que la dépendance des cellules cancéreuses à leurs signalisations, l'implication des récepteurs aux estrogènes dans la pathogénèse avait été confirmé (205). En ce qui concerne ER β , dans l'épithélium normal, cet isoforme présente une expression élevée par rapport à ER α . Mais ce rapport est inversé dans les cancers ovariens (206). Ce fait avait été appuyé récemment par une étude qui démontre que dans une série de 42 tumeurs ovariennes bénignes et malignes, l'expression de ER β était plus élevée dans les tumeurs bénignes, tandis que ER α était plus élevé dans les tumeurs malignes (207).

Des études menées sur l'expression de ER α dans le cancer des ovaires, montrant une bonne association pronostique pour ER α , ont confirmé un meilleur pronostic en termes de survie globale chez les patients ER β -positifs par rapport aux patients ER β -négatifs. Toutefois, ce pronostic n'était pas associé à une survie sans progression (208).

In vitro, il a été démontré que l'estrogène entraîne une stimulation de la croissance dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ovariennes ER α -positives et active ou réprime 228 gènes. En revanche, les estrogènes n'ont pas eu d'effet significatif sur la croissance des lignées ER α -négatives ou ER β -positives (209). L'utilisation des xénogreffes tumorales chez les souris avait démontré que ER β possède des effets inhibiteurs sur la croissance tumorale ovarienne induite par ER α (210). Par ailleurs, la transfection de ER β dans les cellules cancéreuses ovariennes ER α -négatives de type SKOV-3 a entraîné un ralentissement dans la croissance tumorale tout en augmentant l'apoptose (211). Dans les cellules cancéreuses ovariennes de type

OVCAR-3, le traitement par le létrozole, un inhibiteur des aromatases impliquées dans la biosynthèse des estrogènes, améliore la survie dans un modèle de xénogreffe de cellules de carcinome ovarien humain OVCAR-3 fortement ER-positives. Cette amélioration avait été associée à une diminution de l'angiogenèse et de la production d'ascites. Cependant, aucune augmentation dans l'apoptose n'avait été observée (212).

2.8. Les approches thérapeutiques pour antagoniser les ERs

De nombreuses recherches ont été menées sur le mécanisme d'action des récepteurs aux estrogènes, permettant d'identifier des cibles moléculaires qui sont utilisées pour prévenir ou traiter le cancer du sein. En effet, il existe plusieurs approches thérapeutiques pour le traitement des cancers du sein et de l'ovaire. Certaines sont utilisées en clinique, d'autres s'avèrent prometteuses.

2.8.1. Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (SERMs)

Les SERMs (Selective estrogen receptor modulators) sont un groupe de médicaments utilisés dans le traitement et la prévention du cancer du sein, mais aussi dans l'horomo-thérapie contre l'ostéoporose chez les femmes en post-ménopause. Cette ambivalence des SERMs revient à leurs caractères agoniste et antagoniste des estrogènes. Les SERMs notamment, le tamoxifène, le raloxifène, le lasofoxifène et le bazédoxifène, agissent en tant que compétiteurs de l'estrogène en se liant aux récepteurs des estrogènes et bloquant partiellement leurs activités transcriptionnelles. En effet, les SERMs se lient au domaine AF-2, et en raison de leurs structures différentes, ils provoquent un changement conformationnel du LBD différent de celui

produit par les estrogènes. Ce changement conformationnel empêche les coactivateurs de se lier à AF-2 bloquant ainsi l'activation des ERs (213). Le domaine AF-1 reste non affecté et peut provoquer une régulation transcriptionnelle des gènes cibles. C'est pourquoi l'action des SERMs reste partielle (214). Un fait important à considérer dans l'utilisation de ces médicaments c'est qu'ils ne doivent être utilisés que chez les femmes ménopausées plus jeunes, et ils sont particulièrement recommandés s'il existe des antécédents familiaux de cancer du sein invasif, car leur utilisations réduit considérablement l'incidence de ce type de cancer (215). En effet, les taux de BRCA1, l'un des gènes conférant une prédisposition génétique au cancer du sein et de l'ovaire, sont augmenté par les estrogènes (216, 217). Ainsi, une inhibition partielle de ER α par les SERMs contribuerait à la réduction de BRCA1 et par le fait même de diminuer l'incidence du cancer. En fait, les premières preuves suggérant l'interaction entre ER α et BRCA1 proviennent des études sur les souris, qui ont démontré que les taux de BRCA1 augmentent de façon spectaculaire pendant la puberté et la grossesse lorsque les niveaux d'E2 augmentent. De plus, il a été montré que l'expression de BRCA1 était induit après traitement des animaux ovariectomisés avec E2 (24, 25)

2.8.2. Les inhibiteurs des aromatasés

Les inhibiteurs des aromatasés sont plus efficaces et moins toxiques que les SERMs. Ces médicaments agissent en bloquant la principale voie de production des estrogènes chez la femme non ménopausées et non enceintes, et ce au niveau des étapes de la biosynthèse des estrogènes à partir des androgènes (218). Plus spécifiquement, ces médicaments bloquent l'aromatase cytochrome P450 (214). L'aminogluthetimide était le premier médicament utilisé, mais en raison du manque de spécificité des tissus cibles, son utilisation avait engendré des conséquences désastreuses car son inhibition de l'aromatase n'est pas spécifique et engendre

l'inhibition d'autres enzymes du cytochrome P450 dans la voie de la stéroïdogénèse. De ce fait, d'autres inhibiteurs de l'aromatase ont été développés tel que l'anastrozole, le létrozole et l'exémestane. Ces médicaments sont utilisés dans la thérapie du cancer du sein avancé et engendrent des résultats prometteurs conduisant à l'éventuelle possibilité de les utiliser pour remplacer certains SERMs tel que le tamoxifène (213).

2.8.3. Les dégradeurs sélectifs des récepteurs aux estrogènes (SERDs)

Les SERDs (Selective estrogen receptor downregulators) sont un groupe de médicaments qui ont le potentiel de bloquer la signalisation hormono-dépendante et hormono-indépendante de ER α et ce par son ablation. Les SERDs ont été développés pour faire face à la résistance développée par les traitements utilisant les SERMs ou les inhibiteurs des aromatasés (215, 219). Le fulvestrant, ICI 182780, le premier SERD développé, est considéré comme un anti-estrogène total. Son action entraîne une dégradation rapide par le protéasome de ER α (220, 221). Effectivement, il y a une forte corrélation entre la dégradation de ER α et le bénéfice clinique. Cependant, l'efficacité du fulvestrant reste limitée chez certaines patientes (222). L'inefficacité du fulvestrant revient au phénomène de la résistance composée de la signalisation des facteurs de croissance compensatoires indépendant de ER α . Par exemple, dans les cellules ayant acquis une résistance au fulvestrant, on retrouve une régulation positive marquée de Her-2 (Human epidermal growth factor receptor 2) et de la molécule de signalisation en aval MAPK, suggérant que cette voie peut induire le phénotype résistant (223). C'est pourquoi d'autres SERDs ont été développés tel que le GW 5638. Ce dernier avait été utilisé dans des essais cliniques de phase I mais aussitôt abandonné pour des raisons non scientifiques (224). Toutefois, les résultats de ces essais avaient été inspirant pour développer les SERDs GDC-0810 (222) et

AZD -9496 (225, 226) qui font également actuellement leurs chemins à travers le développement clinique.

2.8.4. Anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ont été développés comme perspective médicamenteuse pour bloquer les voies de signalisation intracellulaire engendrée par l'action de E2. Assurément, ces voies de signalisation sont aussi impliquées dans le développement de la résistance au traitement. Her2 (Human epidermal growth factor receptor 2) appartient à la famille ErbB qui regroupe les récepteurs à activité tyrosine kinase. La signalisation de Her2 est impliquée dans le mécanisme de résistance à la thérapie endocrinienne des cellules cancéreuses mammaires ER-positives, car Her2 régule l'activité de ER α de manière hormono-indépendante (227). Partant de ce fait, l'herceptin (trastuzumab) et le Perjeta (pertuzumab) sont des anticorps monoclonaux qui ont été développés pour bloquer le récepteur Her2. L'herceptin est un anticorps monoclonal anti-Her2 recombinant qui cible et se lie de manière sélective et avec une forte affinité pour Her2. Les études *in vitro* et *in vivo* ont démontré qu'il inhibe la prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment Her2 (228). Par ailleurs, des essais pivots à grande échelle ont démontré qu'en monothérapie, le trastuzumab est actif que ce soit chez les femmes prétraitées et non auparavant atteintes d'un cancer du sein métastatique (229). Le perjeta est un anticorps monoclonal qui lie au domaine extracellulaire II de Her2. Son mécanisme d'action est complémentaire de l'herceptin. L'action combinée des deux anticorps inhibe la dimérisation Her2-Her3 ligand-dépendante et réduit la signalisation via des voies intracellulaires telles que la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt) (230-232). Ainsi, l'administration de ces anticorps augmente le temps de survie et diminue les chances de récurrence (233).

2.8.5. Composés interférant avec l'interaction ER-ADN

Les composés qui interfèrent avec l'interaction ER-ADN ou ER-cofacteurs, constituent d'autres alternatives thérapeutiques potentielles. Le TPBM (theophylline, 8-[(benzylthio)méthyl]) et DIBA (dithiobisbenzamide) sont deux composés qui inhibent l'expression des gènes cibles de ER α ainsi que la croissance des cellules cancéreuses mammaires (234, 235). Tous les deux inhibent l'expression des gènes cibles d'ER α et la croissance E2-dépendante des cellules cancéreuses mammaires (288, 289). DIBA interagit avec le motif à doigt de zinc du DBD de ER α , empêchant de ce fait l'interaction de ER α avec les EREs (234).

3. Les chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines de nature basique de poids moléculaires variant entre 8 et 14 kDa. On compte une quarantaine de chimiokines identifiées jusqu'à présent. Leur grand nombre ainsi que leur chevauchement au niveau de la spécificité de leurs récepteurs respectifs, définissent les chimiokines comme étant le groupe de ligands le plus complexe des GPCR (236, 237). Comme le terme chimiokine n'est qu'un néologisme abrégé de cytokine chimiotactique (238), il serait intéressant de noter le rôle des cytokines. Ce sont des glycoprotéines qui agissent comme des signaux de communication entre les cellules avec un pouvoir régulateur sur presque tous les types cellulaires du corps humain. En effet, les effets des chimiokines sont connus particulièrement sur les systèmes : immunitaire, hématopoïétique, endocrinien et le système nerveux (239, 240). Bien que les chimiokines fassent partie de la superfamille des cytokines, ces molécules ont établi leurs propres rôles qui se traduit

principalement dans la migration des leucocytes pendant les inflammations, et ce à travers la signalisation induite par des récepteurs spécifiques de type GPCR (239, 241).

3.1. Structure des chimiokines

La structure des chimiokines est caractérisée par 4 résidus cystéine (C) conservés formants des ponts disulfures entre la première et la troisième, et entre la deuxième et la quatrième cystéine qui sont liées entre elles par des ponts de cystéine. C'est en se basant sur la structure des chimiokines que cette famille de protéines a été divisée en quatre groupes, et ce en considérant l'arrangement des deux premières cystéines (Figure 9). Le premier groupe qui est classé CXC et rassemble les chimiokines dont les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé X. Si aucun acide aminé ne se trouve entre les cystéines, les chimiokines seront classés dans le groupe CC qui est le deuxième groupe. Le troisième groupe concerne la structure qui fait intervenir 3 acides aminés entre les deux cystéines soit CX3C, ce groupe est particulier puisque certaines chimiokines de type CX3C agissent comme récepteurs de surface, tel que CX3CL16 (242) et CX3CL1 (243). Le dernier groupe consiste en un motif qui se caractérise par seulement deux cystéines à la place de 4, c'est le groupe C. Malgré les différences structurelles, voir aussi fonctionnelles des quatre sous-familles des chimiokines, plusieurs d'entre-elles sont encodés par le même cluster de gènes (244).

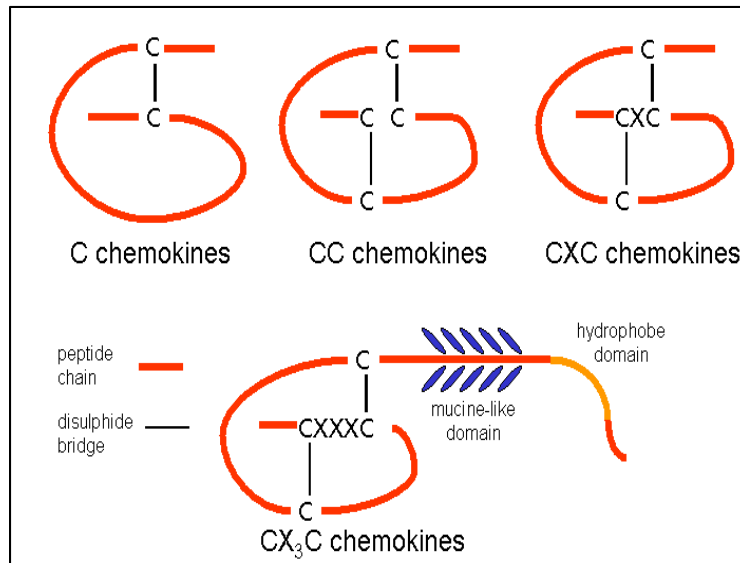


Figure 8. Configuration des 4 classes de chimiokines.

Les 4 classes sont caractérisées par un motif C, CC, CXC et CX₃C, où le C représente un résidu cystéine et X n'importe quel acide aminé. Figure adaptée de (245)

3.2. Les fonctions biologiques des chimiokines

Le rôle central des chimiokines ne demeure pas que dans l'extravasation des leucocytes, mais aussi dans leurs interactions avec les cellules hôtes (246). Des études ont démontré que la maturation des lymphocytes T et B requiert plusieurs chimiokines, soit CXCL12, CXCL13 et CCL20 pour les cellules B et CCL2, CCL3 ainsi que CCL5 pour les cellules T (247-249). Quand des cellules expriment les récepteurs des chimiokines, elles deviennent automatiquement des cibles pour la régulation par les chimiokines. Par exemple, le fait que les cellules dendritiques immatures expriment les récepteurs tel que CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 et CXCR2, les rend susceptibles à la régulation par les chimiokines. L'interaction entre les chimiokines et leur récepteur se traduit par l'attraction et la localisation de ces cellules dendritiques à l'endroit de l'inflammation (250, 251).

Les chimiokines peuvent aussi agir en concert avec d'autres cytokines pour une synergie dans la modulation de la réponse immunitaire. Effectivement, il a été démontré que chez les souris déficientes en CCL12, les cellules TH2 (Type 2 helper) ne produisent plus adéquatement les interleukines IL-4, IL-5 et IL-10, qui sont importantes dans la réponse immunitaire. Ce dysfonctionnement revient au contrôle qu'exerce CCL12 sur la polarisation des cellules TH2 qui conduit à l'activation de CCL12 pour induire la sécrétion des cytokines. Ce sont les TH2 qui vont par la suite amplifier l'immunité humorale (252).

Les chimiokines de types CXC sont hétérogènes dans leurs actions, notamment au niveau de l'angiogenèse et dépendamment de si ces chimiokines sont ELR⁺ ou ELR⁻, c'est-à-dire qu'elles possèdent ou non le motif Glu-Leu-Arg dans leurs séquences. Alors que certaines chimiokines, telles que CXCL8, CXCL7, CXCL1 et CXCL12 qui sont ELR⁺ stimulent l'angiogenèse, les chimiokines de type ELR⁻ comme CXCL4, CXCL10, CXCL9, CXCL19 et CXCL21 inhibent plutôt l'angiogenèse (253).

Les différentes fonctions des chimiokines résultent de l'activation de celles-ci après leurs interactions avec leurs récepteurs, soient les récepteurs des chimiokines.

3.3. Les récepteurs des chimiokines

Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la famille des 7TMRs (Récepteurs à 7 domaines transmembranaires) couplés à la protéine G (GPCR) et sont divisés en quatre groupes en fonction de la famille à laquelle la chimiokine, qui lie le récepteur, appartient. Ces 4 groupes sont CXCR, CCR, XCR et CX3CR, où la lettre R désigne le récepteur. À ce jour, 19 récepteurs ont été découverts pour les 40 chimiokines identifiées, soient 10 récepteurs dans la famille CCR, 7 du type CXCR, 1 du type CX3CR et 1 du type XCR (254). Des récepteurs de différentes

familles peuvent lier une même chimiokine et inversement, un seul récepteur peut lier plusieurs chimiokines, ce qui confère un élément de redondance dans le réseau des chimiokines et leurs récepteurs, tout en gardant des réponses différentes en signalisation cellulaire (255). Des exemples de cette redondance : la chimiokine I-TAC/CXCL11 qui est un ligand pour les récepteurs CXCR7 et CXCR3, la chimiokine SDF-1/CXCL12 liant CXCR4 et CXCR7 ou encore la chimiokine CCL4 qui peut lier CCR1, CCR5 et CCR8 (256).

Les récepteurs des chimiokines partagent plusieurs caractéristiques et possèdent une similitude de séquence (236). Le domaine N-terminal des récepteurs, soit celui qui est exposé à l'extérieur de la cellule, est le domaine le moins conservé entre les différents récepteurs, apportant ainsi une affinité à la liaison du ligand. Par contre, c'est à l'intérieur de ce domaine qu'on retrouve des boucles extracellulaires contenant dans leur structure des résidus cystéines hautement conservés, qui sont responsables du changement conformationnel induit par la liaison du ligand. En effet, la cystéine dans la portion N-terminale fait un pont disulfure avec la cystéine de la première boucle extracellulaire, alors que la cystéine de première boucle extracellulaire forme le pont avec la cystéine de la deuxième boucle (Figure 10) (257). Les ponts disulfures vont permettre un repliement favorable du récepteur en vue d'activer le récepteur et déclencher la signalisation cellulaire (258).

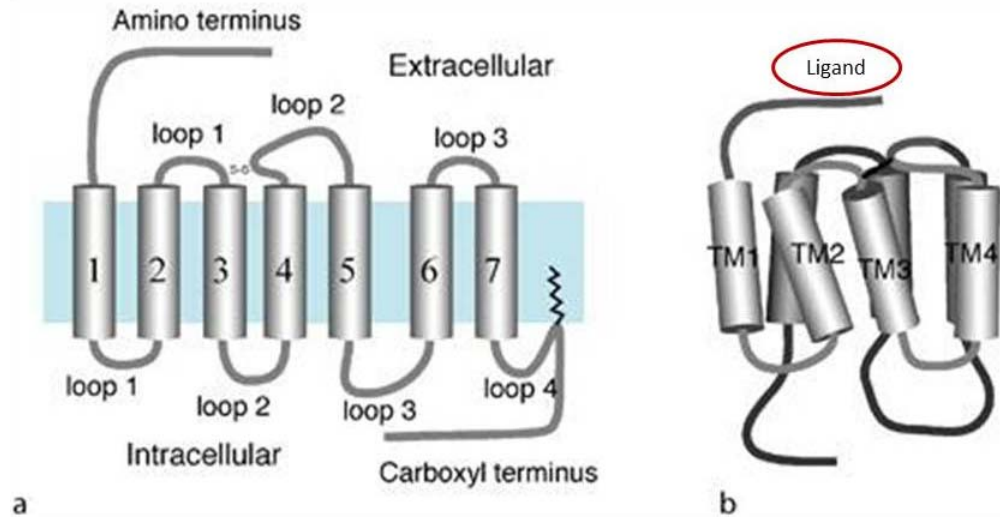


Figure 9. Structure générale des récepteurs des chimiokines.

En (a), la structure bidimensionnelle du récepteur, et en (b) le récepteur après les changements conformationnels induits par la liaison du ligand. Adaptée de (259).

Alors que le domaine extracellulaire du récepteur lie le ligand, les domaines intracellulaires sont impliqués dans le déclenchement du signal et sa transmission dans la cellule. La signalisation du récepteur passe par son interaction avec la protéine G qui interagit avec le domaine DRYLAI qui est situé dans la seconde boucle intracellulaire du récepteur. DRYLAI est hautement conservé entre les récepteurs des chimiokines et aussi entre les récepteurs des chimiokines et certains GPCR (257).

La régulation des récepteurs des chimiokines est contrôlée par plusieurs mécanismes en fonction des cellules cibles et de la réserve en récepteurs chez les cellules. Par exemple, la réserve cellulaire en CXCR4 permet une réponse rapide en signalisation cellulaire suite à l'activation de CXCR4 par son ligand (260). Les chimiokines induisent l'internalisation de leurs récepteurs respectifs. Cette internalisation consiste en une régulation du récepteur qui se traduit par l'arrivée des cellules dans le tissu cible. Le phénomène d'endocytose/exocytose ou encore

appelé recyclage est aussi un mécanisme de régulation des récepteurs qui module la quantité des récepteurs présents à la surface cellulaire. Les récepteurs des chimiokines subissent la dégradation par le mécanisme d'internalisation dans le but de réguler un niveau adéquat des récepteurs à la surface de la cellule (257).

3.3.1. Le récepteur des chimiokines CXCR7

CXCR7 est un récepteur à sept passage transmembranaire. Initialement, il portait le nom RDC1 et il fût isolé puis cloné à partir d'une banque d'ADNc de thyroïde de chien (261). Chez l'humain, le gène *CXCR7* est localisé sur le chromosome 2q37.3 soit le même chromosome codant pour le récepteur CXCR4 (262, 263) avec qui CXCR7 partage la même spécificité du ligand. Il est actuellement accepté que CXCR7 possède deux ligands, CXCL12/SDF-1 (Stromal cell-derived factor-1) et CXCL11/I-TAC (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant) qui, à leurs tours se lie à CXCR4 et CXCR3 respectivement (264, 265). Relativement à ce point, SDF-1 se lie à CXCR7 avec une plus grande affinité que CXCR4 (264, 266), et CXCR7 se lie à SDF-1 avec 10 à 20 fois plus d'affinité que I-TAC (265).

Les récepteurs des chimiokines sont généralement connus pour réguler le trafic des leucocytes (267). C'est pourquoi, un grand effort avait été fournis pour déterminer la fonction de CXCR7 dans les leucocytes. En ce qui concerne les cellules hématopoïétiques, l'expression de CXCR7 reste controversée (268-270). Par ailleurs, des études ultérieures ont montré que les monocytes et les cellules B matures expriment un niveau élevé de CXCR7 qui corrèle négativement avec l'activité de CXCR4 sur les cellules B (271, 272). Il a été démontré que les taux élevés de CXCR7 dans les cellules B, agissait en faveur sur leur survies et leur production

d'anticorps (270). Ces résultats suggèrent une fonction qui distingue CXCR7 des autres récepteurs de chimiokines.

La plupart des 7-TMR contiennent le motif DRY (Asp-Arg-Tyr) dans la deuxième boucle intracellulaire. Ce motif contrôle la chimiotaxie dans CXCR4 à travers G α i (273-275). Au niveau de CXCR7, le motif canonique DRYLAIV est modifié à deux positions, où A est remplacé par S et V par T donnant la séquence DRYLSIT (275). Cette séquence est également trouvée dans d'autres 7-TMR, y compris les récepteurs adrénergiques α 2 et β 1, le récepteur muscarinique de l'acétylcholine et le récepteur de la sérotonine. De ce fait, CXCR7 est inclus dans le groupe atypique des récepteurs de chimiokines (276, 277), et son deuxième nom est AKR3 (Atypical Chemokine Receptor 3). CXCR7 est considéré comme un récepteur de atypique car le motif DRYLSIT fait que CXCR7 ne fonctionne plus comme un GPCR (G-protein-coupled receptors) (278). Cependant, d'autres signaux couplés au contrôle de la survie et de l'adhésion des cellules qui sont médiés par CXCR7 ont été observés (265, 279, 280). Ces observations sont liées à la capacité de CXCR7 à recruter la β -arrestine entraînant une activation de la MAP-kinase (281-283). De plus, CXCR7 peut s'hétérodimériser avec CXCR4 conduisant à une modulation des réponses induites par CXCL12 en aval de G α i (282, 284, 285). En effet, certaines fonctions des chimiokines sont régulées par des récepteurs dimérisés ou oligomérisés (286-288). L'hétérodémirisation de CXCR7/CXCR4 avait été détecté en surexpression dans les cellules HEK293, et cette hétérodimérisation dépend du niveau d'expression des deux récepteurs. À savoir que l'efficacité des hétérodimères est la même que les homodimères lorsque CXCR4 et CXCR7 sont co-exprimés à des niveaux similaires (284).

3.3.1.1. Les ligands de CXCR7, SDF-1/CXCL12 et ITAC/CXCL11

SDF-1 est une chimiokine qui induit la migration des cellules souches hématopoïétiques, des cellules endothéliales et de la plupart des leucocytes. L'importance de son rôle l'implique dans divers processus physiologiques et pathologiques, notamment, l'embryogenèse, l'hématopoïèse, l'angiogenèse et l'inflammation. SDF-1 est fortement exprimé dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse. Une expression plus faible de la chimiokine est retrouvée dans d'autres tissus soient, l'intestin grêle, les reins, la peau, le cerveau et le muscle squelettique. Ce contraste dans les niveaux d'expression de SDF-1 est bénéfique car il constitue un bon indicateur des sites de métastases (289). Par ailleurs, des conditions pathologiques tels que l'inflammation, l'hypoxie, les maladie auto-immunes et les environnements pro-angiogéniques sont à l'origine de l'induction de SDF-1, suggérant son rôle pro-inflammatoire dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et la néphrite (290, 291). Cependant, d'autres rapports associent un rôle plutôt anti-inflammatoire à SDF-1. En effet, il a été démontré que SDF-1 recrute les cellules en réponse à l'inflammation en provoquant la polarisation des cellules T en cellules T régulatrices (290, 292) et générant des cellules dendritiques (DC), et des macrophages (293). Il se trouve que cette transformation dans le rôle de SDF-1 soit associé au changement dans l'expression de CXCR7 à la membrane qui, à son tour, modifierait la façon dont les cellules répondent à SDF-1 (294).

De son côté, I-TAC, est principalement exprimée dans les leucocytes du sang périphérique, le pancréas, le foie, le thymus, la rate et les poumons. Dans l'intestin grêle, le placenta et la prostate, I-TAC est exprimé à des niveaux plus bas. L'expression de I-TAC est stimulée par des interférons dans une variété de cellules comprenant des leucocytes, des

fibroblastes et des cellules endothéliales; ainsi, ses niveaux augmentent pendant l'infection ou le cancer (295).

3.3.2. L'expression de CXCR7

Depuis que CXCR7 soit découvert, environ 20 ans, le profil d'expression de la protéine dans les tissus sains reste confus. Toutefois, l'ARNm de CXCR7 a pu être détecté par PCR et Northern blot dans le cœur, le cerveau, la rate, les reins, les poumons, les testicules, les ovaires, la thyroïde, le placenta et le thymus (261, 265, 296). De son côté, l'immunohistochimie a pu révéler CXCR7 dans les amygdales (270) cerveau (297) placenta (298) reins (299) et le cordon ombilical (278). Toutefois, les anticorps anti-CXCR7 utilisés dans certaines de ces études ne sont pas spécifiques à CXCR7 (268) rendant la coloration en immunohistochimie inauthentique. Il a été démontré que la protéine CXCR7 était exprimée sur les cellules transformées, sur la vascularisation associée à la tumeur (265) ainsi que dans divers contextes pathologiques (299) et les articulations enflammées (300). En effet, tout comme CXCR4 et SDF-1, l'expression de CXCR7 est régulée par NF- κ B (kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) (301) et HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) (302). En revanche, le gène suppresseur de tumeur HIC1 (hypermethylated in cancer 1) réprime l'expression de CXCR7 (303) appuyant que l'expression de CXCR7 soit induite dans les tumeurs. CXCR7 est aussi exprimé dans la moelle osseuse, et ce au niveau des lymphocytes, granulocytes, les monocytes, les granulocytes et les plaquettes (301). Une expression résiduelle de CXCR7 avait été détecté au niveau des monocytes, les lymphocytes T (293, 297) les monocytes (293), les cellules B (270, 304), les NK (natural killer), les basophiles (270) et les DC (Dendritic cells) (305).

3.3.3. Régulation de l'expression de CXCR7

3.3.1.1. Régulation de CXCR7 dans le système immunitaire

L'expression de CXCR7 augmente au cours du développement des cellules B. cette augmentation est expliquée par l'importance de CXCR7 pour le fonctionnement, la survie et la différenciation des cellules B matures, puisque seules les cellules B mémoire CXCR7+ peuvent survivre et produire des anticorps (270). L'expression de CXCR7 dans les DC est régulée par différents stimulus. Si les DC ont acquis la maturité par LPS (Lipopolysaccharide) elles expriment CXCR7, si leur maturité est induite par TNF α (270) les DC n'exprimeront pas CXCR7 (306). Il est connu que le LPS induit l'expression de TNF α dans plusieurs cytokines. Partant de ce fait, il a été inféré que contrairement aux cellules B, l'expression de CXCR7 dans les DC est importante au début de la réponse innée. Par ailleurs, l'expression de CXCR7 dans les DC peut diminuer suite à l'augmentation de TNF α réduisant ainsi leur capacité à répondre à CXCL12 (294).

3.3.1.2. Régulation de CXCR7 durant l'embryogénèse

Le rôle de *Cxcr7* durant l'embryogénèse de la souris avait été démontré par plusieurs études. Au cours du jours 10.5 (E10.5), les transcrits de *Cxcr7* ont été observés dans le cœur, le tube neural, le cerveau et le septum (285) avec un changement subséquent dans le profil d'expression dans le cœur à E14.5 (285). L'expression de *Cxcr7* correspond à des périodes de croissance accélérée et de vascularisation. D'autre part, lorsque les souris knock-out CXCL12 et *Cxcr4* meurent (265, 307, 308), l'expression de *Cxcr7* entre E15 et E17 est perdue (265) suggérant que *Cxcr4* devient critique dans le développement embryonnaire en même temps

l'expression de *Cxcr7* diminue (265). Ces observations stipulent que l'expression de *Cxcr7* corresponde aux périodes de croissances accélérées et de vascularisations (309).

De plus, l'utilisation de souris déficientes en *Cxcr7* soutiennent son un rôle essentiel dans le système vasculaire mais pas dans l'hématopoïèse (305). En effet, au cours des stades E13-E15, l'expression de *Cxcr7* favorise la croissance accélérée du bourgeon hépatique, qui vascularisé, devient le principal organe hématopoïétique fœtal. Par la suite, le déclin de l'expression de *Cxcr7*, qui coïncide avec la mobilisation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) du foie fœtal à la rate et à la moelle osseuse, fait intervenir *Cxcr4* pour compenser le manque de *Cxcr7* principalement dans les stades E15-E17 (265, 305).

3.3.1.3. Régulation de CXCR7 par les estrogènes

Chez les poissons zèbres, la fonction de *cxcr7* dépend de deux gènes, *cxcr7a* et *cxcr7b*. Il a été démontré que l'inactivation de ER α entraîne la perte de l'expression de *cxcr7b* (310). Le peu d'études ayant été menées sur les cellules cancéreuse mammaires humaines, révèlent que les estrogènes induisent une régulation positive de l'ARNm de CXCL12 et de CXCR4 mais inhibent l'expression de l'ARNm de CXCR7 (311). De plus, la régulation négative de CXCR7 par les estrogènes pourrait être significative au cours de l'embryogenèse, car les niveaux d'estrogènes augmentent au stade final de la grossesse. Au niveau des cellules cancéreuses de l'endomètre, l'estrogène augmente significativement les niveaux de CXCR7 et SDF-1, et restaure la migration et la croissance des cellules diminuées par CXCR7. Dans une précédente étude, nous avons démontré une boucle de régulation entre le ligand de CXCR7, SDF-1, et les estrogènes. Cette boucle de régulation était impliquée dans la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses mammaires ER $^{+}$. Dans ce contexte, l'estrogène active la transcription de

l'ARNm de SDF-1. Nous avons démontré que SDF-1 interagissait avec son deuxième récepteur, CXCR4, qui à son tour potentialisent l'activité des récepteurs aux estrogènes par phosphorylation (117). Une autre étude avait confirmé la régulation de SDF-1 par les estrogènes dans le cancer du sein. La sécrétion de SDF-1 a été détectée dans le milieu cellulaire de la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 suite au traitement avec l'estrogène. Cependant, cet effet diminué pouvait être éliminé par l'antagoniste des estrogènes pur ICI-182 ou ICI-780 (312).

3.3.4. Activation de CXCR7

Le mécanisme d'activation des 7-TMR (Seven transmembrane receptor) est indépendant de la structure du ligand lié (313). Toutefois, la liaison du ligand entraîne des changements dans les régions transmembranaires (313) ainsi que des changements du côté intracellulaire (314), permettant la liaison des protéines notamment la protéine G ou la β -arrestine, qui initient les voies de signalisation en aval. Effectivement, il a été démontré que la signalisation et la conformation de CXCR4 sont stabilisées par la liaison de SDF-1 (315). De son côté, CXCR7 stabilise son association avec la β -arrestine grâce à la liaison du ligand SDF-1 ou I-TAC (283). CXCR7 est un 7-TMR dont la signalisation n'a pas encore été clairement élucidée. Les études démontrant que la liaison de I-TAC n'induit pas la mobilisation de calcium ou la signalisation de ERK1/2 ou de AKT (316), de même que la liaison de SDF-1 n'induit pas la mobilisation du calcium ou de migration cellulaire (265), à travers la protéine G, ont poussé les chercheurs à classer CXCR7 dans le groupe des récepteur leurres. Cependant, plusieurs études ont été effectuées prouvant l'implication de CXCR7 dans la signalisation (297, 317-321) et la migration (264, 283, 284, 293, 317, 322-326), s'opposant à considérer CXCR7 comme un récepteur leurre.

3.3.5. Signalisation de CXCR7

Bien que CXCR7 soit un 7_TMR et se lie à deux chimiokines SDF-1 et I-TAC, sa signalisation GPCR classique n'a pas pu être démontrée (265). En se basant sur le fait que CXCR7 interagit de manière constitutive avec les protéines G α i, sans les activer (284), certaines études supportent une que CXCR7 soit un récepteur entièrement indépendant des protéines G. Ce qui n'est pas tout à fait faux, car des études ont pu mettre en évidence une signalisation de CXCR7 à travers la β -arrestine (283, 317). Récemment, le recrutement de la β -arrestine-2 de manière dépendante du ligand par CXCR7 ainsi que la signalisation à travers cette protéine indépendamment de la protéine G, avait été confirmé par Rajagopal et al. (283). En effet, le recrutement de la β -arrestine est induit par les résidus sérine/thréonine présent dans le C-terminal de CXCR7 (327, 328). Comme discuté dans la section précédente, l'association de la β -arrestine-2 avec CXCR7 est stable et durable, contrairement à celle avec CXCR4 qui est transitoire (282). C'est probablement pour cette raison que, les voies en aval dépendantes de la β -arrestine, y compris ERK1/2, p38 et MAPK sont potentialisées par le recrutement constitutif de la β -arrestine par CXCR7 suggérant entre autre que CXCR7 induit la migration cellulaire par la voie de β -arrestine (317). Par ailleurs, la liaison de SDF-1 à CXCR7 avait été étudiée dans plusieurs systèmes cellulaires démontrant l'activation de Akt et MAPK dans le gliome (297), les astrocytes et les cellules de Schwann (283). La signalisation de CXCR7 s'étend jusqu'à la signalisation de CXCR4. En effet, il a été rapporté que CXCR7 module les signaux de CXCR4 via l'hétérodimérisation de CXCR7-CXCR4 (284). Outre son effet sur l'activation de CXCR4, CXCR7 peut fonctionner comme un récepteur scavenger des chimiokines I-TAC et SDF-1 en les internalisant (278, 283). Cet effet, génère un gradient de chimiokine qui a pour effet d'optimiser la réponse migratoire de CXCR4 (329)

3.3.6. Les rôles biologiques de CXCR7

Plusieurs études ont indiqué le rôle de CXCR7 dans l'adhésion et la migration dirigée (264, 283, 284, 293, 317, 322-326, 330-334). Cette capacité migratoire de CXCR7 l'implique dans plusieurs aspects physiologiques. Chez le poisson-zèbre, CXCR7 est impliqué dans la morphogénèse embryonnaire, car la migration des cellules germinales primordiales qui proviennent du tissu embryonnaire pour coloniser le primordium gonadique, est dirigée par la chimiokine SDF-1, qui signale à travers CXCR7 (324, 325) et CXCR4b (335).

La formation de la plaque corticale au cours de la corticogénèse est assurée par la migration des interneurons dont la régulation se fait par CXCR4 et CXCR7 tel que démontré par Sánchez et al. Dans cette étude, ils ont trouvé que CXCR4 et CXCR7 sont co-exprimés dans des interneurons en migration, et que CXCR7 est non seulement essentiel pour la signalisation de SDF-1, mais il module aussi la fonction de CXCR4 (332).

Bien que la capacité de CXCR7 à réguler la niche des cellules souches de la moelle osseuse reste incertaine et devrait être étudiée plus en profondeur, des études ont démontré que la régénération de la niche des cellules souches est en partie assurée par CXCR7. La signalisation de CXCR7 favorise la rétention des cellules B dans la moelle osseuse (304) tandis que l'expression de CXCR7 pourrait être nécessaire pour diriger les cellules souches hématopoïétiques vers leurs niches. Dans ce cas-là, CXCR7 est en mesure de maintenir la capacité migratoire des cellules. De plus, la liaison constitutive de SDF-1 à CXCR7 diminuant ainsi les niveaux de SDF-1, est favorable à la régénération de la niche des cellules souches (294).

Chez les souris SCID (Severe combined immunodeficiency) présentant une insuffisance rénale aigue, la greffe de cellules progénitrices, est médiée par une forte régulation positive de

SDF-1 diminuant la sévérité de l'insuffisance rénale aiguë, tout en empêchant la fibrose rénale. De ce fait, le blocage de CXCR4 ou CXCR7 supprime les bienfaits de la greffe car le nombre de cellules progénitrices rénales greffées diminue considérablement. Sur ce point, CXCR7 étant essentiel pour l'adhésion des cellules progénitrices rénales, la migration transendothéliale nécessitait l'activité de CXCR7, suggérant le rôle essentiel de CXCR7 dans la thérapie des cellules progénitrices rénales humaines (331).

CXCR7 possède un rôle central dans la différenciation et la polarisation (270, 293). Effectivement, le ligand SDF-1 régule la différenciation des monocytes en macrophages. Les monocytes primaires sécrétant SDF-1 et exprimant les récepteurs CXCR4 et CXCR7, conduisent à une boucle autocrine/paracrine qui contribue à la différenciation des monocytes par l'inhibition de RUNX3, un facteur de transcription qui inhibe CD4, favorisant ainsi l'expression de CD4 et CD14, qui sont entre autre, spécifiques aux macrophages (293). Il semble que CXCR7 peut contribuer à la polarisation des cellules immunitaires de par son rôle dans la différenciation cellulaire. En effet, les résultats générés par Infantino et al. démontrent que la différenciation des cellules B mémoires en cellules plasmiques, corrèle avec l'expression de CXCR7 dans les cellules B, suggérant le rôle de CXCR7 dans la fonction des cellules B matures et leur survie (270).

Récemment, une étude a déterminé le rôle de CXCR7 dans l'athérosclérose et le remodelage vasculaire. Après une lésion vasculaire, les souris hyperlipidémiques déficientes en CXCR7 présentent une augmentation du taux de cholestérol sérique et accumulent les macrophages lésionnels. Inversement, l'administration du ligand synthétique CCX771 de CXCR7 à des souris Apoe (-/-) a inhibé la formation de lésions et a amélioré l'hyperlipidémie, et ce après une lésion vasculaire et pendant l'athérosclérose. Le traitement par CCX771 a réduit

les taux de VLDL et a augmenté l'absorption de lipoprotéines de très basse densité dans le tissu adipeux blanc exprimant CXCR7, suggérant que CXCR7 régule le cholestérol sanguin en favorisant son absorption dans le tissu adipeux. Cet effet de CXCR7 pourrait être bénéfique pour les maladies vasculaires d'athéroscléroses (336).

3.3.7. Les conséquences pathologiques de la signalisation de CXCR7

CXCR7 est fortement exprimé durant le processus de développement biologique, mais son expression diminue après la naissance et devient plus faible dans les cellules sanguines saines (337). Récemment, plusieurs études associent l'expression de CXCR7 aux phénotypes tumoraux agressifs dans plusieurs types de cancers, y compris le cancer du côlon (263), le cancer du sein (257, 264), le cancer de l'ovaire (338) le carcinome hépatocellulaire (265) et les cancers colorectaux (266). Bien que les 7-TMR restent la classe de récepteurs la plus ciblée en thérapie, les recherches sur CXCR7 ont été significativement retardées puisque ce récepteur a longtemps été considéré comme orphelin (305). Le développement d'antagoniste sélectifs CCX733 et CCX754 (265), l'agoniste CCX771 (334), la surexpression, l'abolition ou le knock-out de CXCR7 (285) ainsi que des souris mutantes (332) ont été les outils qui ont aidé à élucider les mécanismes de CXCR7 impliqués dans la pathologie.

L'utilisation de souris déficientes en *cxcr7* a démontré le rôle de CXCR7 dans la vasculogénèse, l'angiogénèse et la néovascularisation tumorale. Ces souris présentent de graves anomalies cardiaques et 95% sont mortes en 24h. L'utilisation de souris Tie2-Cre ayant pour effet de récapituler la déficience en *cxcr7*, soutient que le phénotype létal est probablement causé par l'expression défectueuse de CXCR7 dans les cellules endothéliales (285). En effet, le profil génétique pour ces souris déficientes en *cxcr7*, révèle que les gènes essentiels à la formation de

la valve, la protection des vaisseaux ou à la croissance et à la survie des cellules endothéliales, ont été altérés (285).

Par le biais de la surexpression de CXCR7 et l'interférence à l'ARN dans les cellules cancéreuses du poumon, il a été démontré qu'indépendamment de CXCR4, CXCR7 favorise les métastases pulmonaires chez les souris immunodéficientes. Dans la même étude, le knockdown de *cxc7* dans les poissons zèbres démontre son rôle dans la vasculogénèse et l'angiogénèse au cours du développement (280). Par ailleurs, il a été trouvé que la surexpression de CXCR7 dans les cellules cancéreuses mammaires murines améliore l'angiogénèse en favorisant le développement de la tumeur (339). De manière intéressante, la régulation des facteurs angiogéniques IL-8 (Interleukin-8) et VEGF (Vascular endothelial growth factor) par CXCR7 dans les cellules cancéreuses de la prostate, vient clarifier le mécanisme de CXCR7 dans l'angiogénèse (340). Prises ensemble, ces études démontrent le rôle potentiel de CXCR7 dans la vasculogénèse, l'angiogénèse et la néovascularisation tumorale, ouvrant de nouvelles voies à explorer pour bloquer l'angiogénèse tumorale.

CXCR7 contribue également dans le développement, la survie et la croissance tumorale par son rôle dans la prolifération (321, 340-343). Dans les cellules souches progénitrices hématopoïétiques humaines normales, la survie cellulaire est induite par SDF-1 et la dérégulation de CXCR7 favorise la prolifération (331). L'effet prolifératif de CXCR7 avait été soutenu par l'utilisation d'antagonistes sélectifs chez des souris greffées avec des cellules cancéreuses (265, 280).

3.3.7.1. L'axe CXCR7/SDF-1/CXCR4 dans le cancer de l'ovaire

La chimiokine SDF-1 et ses récepteurs, CXCR4 et CXCR7, sont impliqués dans la progression du cancer et les métastases. Au niveau de l'ARNm et des protéines, l'expression accrue de SDF-1 et CXCR4 avait été démontrée dans le cancer épithélial de l'ovaire et dans les lignées cellulaires cancéreuses ovariennes (7-12). Avant que le ligand SDF-1 soit aussi attribué à CXCR7, CXCR4 et SDF-1 avaient été détecté dans le cancer de l'ovaire, grâce aux biopsies, dans une sous-population de cellules tumorales de cancer de l'ovaire de 63 patients. Dans ce contexte, à travers CXCR4, SDF-1 induisait la migration des cellules cancéreuses dans la péritoine par l'activation d'un flux de calcium intracellulaire mettant au jour une voie potentielle pour la propagation du cancer de l'ovaire (344). La signalisation de SDF-1 exerce de multiples effets biologiques dans le cancer de l'ovaire, et amplifie la croissance et la migration cellulaire (345). Plusieurs études ont par la suite confirmé l'implication de l'axe SDF-1/CXCR4 à rendre le cancer de l'ovaire plus agressif (346-350).

En ce qui concerne la signalisation de SDF-1 à travers CXCR7, les niveaux protéiques de CXCR7 sont spectaculairement augmentés par SDF-1 témoignant l'existence de l'axe SDF-1/CXCR7 dans le cancer de l'ovaire. La signalisation de SDF-1 à travers CXCR7 dans le cancer de l'ovaire, induit l'expression de la MMP-9 via la phosphorylation de p38 amplifiant ainsi le caractère invasif des cellules cancéreuses ovariennes. L'invasion cellulaire atténuée par l'interférence à l'ARN de CXCR7 est améliorée par SDF-1 indique la fonction de cet axe dans le cancer de l'ovaire. Les résultats de cette étude suggèrent des cibles potentielles à explorer dans le développement thérapeutique ultérieur (351).

L'acquisition de la capacité d'invasion et de métastase par transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), par les cellules cancéreuses, jouent un rôle important dans l'oncogenèse. Dans le cancer épithélial de l'ovaire, CXCR7 facilite la métastase des ganglions lymphatiques à travers la phosphorylation de Akt et Erk impliquant les biomarqueurs (vimentine, Slug, N-cadhérine et E-cadhérine) (338). Ainsi, CXCR7 régule le processus EMT impliqué dans l'invasion et la métastases des cellules cancéreuses de l'ovaire (338).

4. Les Peptidyl prolyl *cis/trans* isomerasases (PPIases)

Les PPIases ont été découvertes en 1984 par Gunter Fischer et ses collègues (352). Ce sont des enzymes qui catalysent l'isomérisation *cis/trans* des liaisons peptidiques précédant l'acide aminé proline. Normalement, la rotation de ces liaisons dans les protéines sont restreintes à cause de l'encombrement stérique. Toutefois, les PPIases interviennent pour faciliter l'interconversion *cis/trans* dans les protéines substrats (353, 354). Il existe trois familles distinctes de PPIase, les cyclophilines (CyP), les FKBP (protéines de liaison FK506) et les parvulines. Tous les trois sont conservés parmi les eucaryotes, les procaryotes et les archées (355-357). Chez l'homme on retrouve deux parvulines, Pin1 et Par14/17 qui sont des isoformes codées par le même gène (358, 359). Dans les eucaryotes, les PPIases peuvent être trouvées dans tous les compartiments cellulaires, y compris le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le noyau et le nucléole (360).

4.1. Structure de Pin1

Pin1 est une peptidyl propyl isomérase dont la découverte revient au criblage double-hybride avec la protéine kinase mitotique NIMA (never in mitosis gene A), effectué par Lu et

al. (358). Pin1 est constitué de deux domaines : le domaine WW situé dans N-terminal impliqué dans la reconnaissance de la protéine et son interaction avec cette protéine, et le domaine catalytique PPIase, dans C-terminal, responsable de l'activité isomérase de Pin1(15).

La Proline adopte uniquement des conformations cis et trans, un processus qui est catalysé par les peptidyl-prolyl isomérases (PPIases). Le motif pSer/Thr-Pro réduit le processus d'isomérisation cis-trans intrinsèquement lent, et rend les liaisons peptidiques inaccessibles pour toutes les PPIases connues à l'exception de Pin1 (361). La liaison de Pin1 aux protéines sur les motifs pSer/Thr-Pro se fait par le domaine WW (362). Ce dernier, est capable de se lier aux conformations cis ou trans d'un motif pSer/Thr-Pro (363), car WW présente presque la même affinité pour les deux conformations. Ainsi, Pin1 est en mesure de catalyser l'interconversion entre les deux conformations (Figure 10) (364).

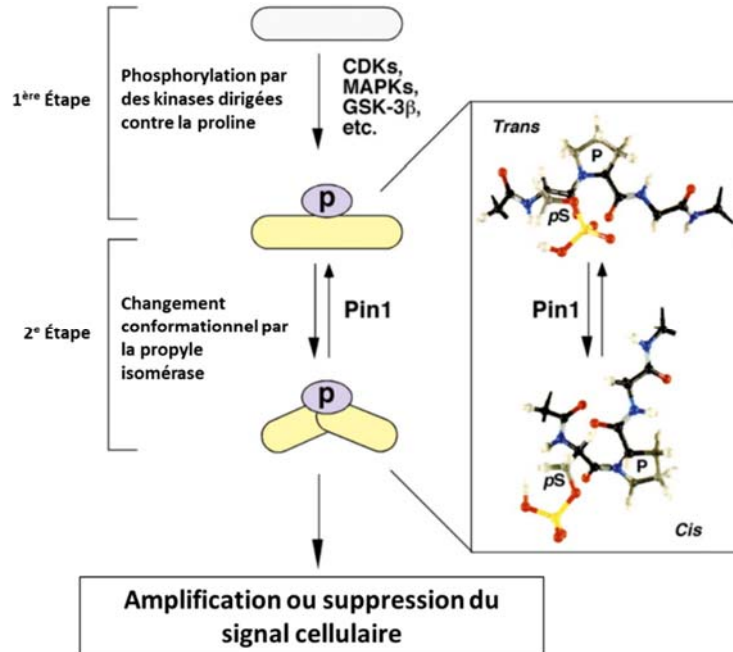


Figure 10. Changement conformationnel catalysé par l'isomérase.

Représentation des formes isomères trans et cis d'une liaison peptidique X et de l'interconversion stimulée par les prolyl isomérases. En premier lieu, la phosphorylation de protéines par des kinases dirigées contre la proline crée des sites de liaison pour la prolyl-isomérase Pin1 (1^{er} étape). En deuxième lieu, la prolyl-isomérisation subséquente par Pin1 induit des changements conformationnels et régule ainsi la fonction des protéines cibles (2^e étape). Adaptée de (365)

4.2. Mécanisme d'action de Pin1

L'isomérisation cis-trans catalysée par Pin1 pourrait définir quel type de phosphatase peut agir sur les protéines. Par exemple, Pin1 favorise la déphosphorylation des motifs trans-phospho-Ser/Thr-Pro dans Cdc25C et Tau par la PP2A (Phosphatase 2A) (366), alors qu'elle favorise la déphosphorylation du motif cis-phospho-Ser5-Pro du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (CTD) par la protéine phosphatase Ssu7213 (367). En fait, les changements conformationnels des protéines substrats induits par Pin1 peuvent survenir en liant le domaine WW sans pour autant que l'activité catalytique de Pin1 soit impliquée. Pour déterminer l'implication catalytique de Pin1, Nakamura et al. (368) ont pu générer des anticorps spécifique au motif Ser/Thr-Pro phosphorylé en position cis et trans. L'utilisation de ces anticorps s'avère importante afin d'évaluer directement l'état d'isomérisation cis-trans de liaisons individuelles au niveau du motif pSer/Thr-Pro in vivo et fournir des preuves de leur fonction ou régulation spécifique à la conformation (368).

Pin1 joue un rôle central dans les différents processus biologiques notamment, la croissance, la survie, la migration, l'invasion et la métastase des cellules tumorales (361, 362, 365, 366, 369, 370). Ceci revient au fait que Pin1 soit régulé par des stimulus extracellulaires et intracellulaires et que lui-même régule les structures et les fonctions d'une large gamme de molécules. Le rôle de Pin1 dans le développement des tumeurs a été élucidé par l'utilisation des

souris. Il a été démontré que l'ablation de Pin1 chez la souris semble être efficace pour empêcher Her2 ou Ha-Ras d'induire l'expression de la cycline D1 (371). Par ailleurs, la surexpression de Pin1 dans les glandes mammaires de la souris induit une duplication du centrosome, une mauvaise ségrégation des chromosomes et une aneuploïdie, et entraîne des tumeurs mammaires malignes (372). Pin1 peut également influencer la stabilité des protéines substrats en augmentant ou en diminuant leur ubiquitination. En effet, il a été démontré que Pin1 travaille avec différentes ubiquitine ligases E3 pour réguler la dégradation des protéines tel que les oncogènes c-Myc (373) et cycline E (374).

4.2.1. Régulation des kinases et des phosphatases par Pin1

Les mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation, assurés par les kinases et phosphatases respectivement, sont impliqués dans toutes les activités cellulaires. Il se trouve que Pin1 soit très impliqué dans la régulation des kinases et des phosphatases, et ce au niveau de la membrane plasmique aussi bien qu'au niveau du noyau (375).

Dans la voie de signalisation induite par MAPK, Pin1 interagit avec Raf-1. Ce dernier étant phosphorylé par ERK dans le but de le désensibiliser, subira une isomérisation cis-trans par Pin1 conduisant à sa déphosphorylation par PP2A. Cette déphosphorylation rend Raf-1 disponible pour la signalisation. Ainsi, Pin1 devient nécessaire pour le recyclage de Raf-1. En effet, il a été démontré que l'inhibition ou le déficit en Pin1 bloquait l'activation de Raf-1 par PDGF (376). Bien que la stimulation par EGF phosphoryle MEK1/2 et ERK1/2, Pin1 interagit directement avec MEK1/2 mais indirectement avec ERK1/2 (377). En ce qui concerne JUNK, l'interaction avec Pin1 se fait directement sur le résidu Thr183 phosphorylé catalysant

l'isomérisation de JUNK cis-trans au niveau du motif phospho-Thr183-Pro. Ce changement structurel inhibe la déphosphorylation de JUNK rendant son activité plus stable (378).

AKT est une autre voie de régulation centrale pour de nombreuses fonctions cellulaires, et elle est une cible de régulation par Pin1. Cliniquement, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein, la combinaison de taux élevés d'AKT-pS473 et de niveaux élevés d'expression de Pin1 est considérée comme étant de pronostic défavorable. Ceci est attribué à la stabilité de la phosphorylation de l'AKT au niveau du résidu S473 qui est maintenue grâce à la liaison de Pin1 sur T92 et T450 de l'AKT. En effet, cette liaison est nécessaire pour le maintien de la stabilité de l'AKT et de la phosphorylation de l'AKT à S473 (379).

4.2.2. Régulation transcriptionnelle par Pin1

4.2.2.1. Les facteurs de transcription impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches et la pluripotence

Le rôle crucial que joue Pin1 dans le maintien de la prolifération des cellules souches germinales avait été démontré dans des souris Pin1 KO dans les quelles, la prolifération cellulaire et le poids corporel avaient été diminués. Ces souris KO ont aussi subi une neuro-dégénérescence et une altération du développement des glandes mammaires (380, 381) ainsi qu'une atrophie testiculaire (382). Pour expliquer l'induction et le maintien de la pluripotence par Pin1, des études ont été réalisées démontrant que STAT3, Nanog et Oct4 qui sont des joueurs importants dans le renouvellement des cellules souches, étaient régulés par Pin1 (380, 383, 384). En effet, Pin1 reconnaît phospho-S727-Pro de STAT3, conduisant à la liaison du co-activateur transcriptionnel p300 à STAT3 favorisant l'activité transcriptionnelle de STAT3. De son côté, Nanog est stabilisé par Pin1 au niveau des sérines S52, S65, S71 ce qui supprime son

ubiquitination. Finalement, pour Oct4, Pin1 interagit avec le motif S12-Pro phosphorylé, augmente sa stabilité et par conséquent son activité transcriptionnelle (380, 383, 384).

4.2.2.2. Pin1 régule les facteurs cycline D1, cycline E et c-Myc

Pin1 régule un large éventail de facteurs de transcription qui favorise le développement tumoral. La cycline D1, qui est l'un des régulateurs du cycle cellulaire les plus fréquemment modifiés dans les cancers, est un substrat direct de Pin1. Ce dernier se lie à la cycline D1 phosphorylée au résidu T286-Pro par GSK3 β stabilisant ainsi la cycline D1 (381, 385). De plus, Pin1 régule la fonction de la cycline D1 par d'autres facteurs de transcription tels que la β -caténine qui à son tour régule positivement la transcription de cycline D1 et c-Myc (386). En plus de réguler l'expression de c-Myc par le biais de la β -caténine (386), Pin1 se lie directement à c-Myc au niveau de S62 phosphorylé par ERK ou CDK et favorise le recrutement de c-Myc et de ses co-activateurs (387). Pin1 régule également la stabilité de la cycline E. À savoir que la liaison de Pin1 au complexe cycline E-CDK2 dépend de la phosphorylation de la cycline E à S384 par CDK2 (374).

4.2.2.3. Les facteurs de transcription impliqués dans la suppression tumorale

Pin1 régule un grand nombre de suppresseurs tumoraux et d'inhibiteurs de croissance. SMRT (Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) est un co-répresseur transcriptionnel qui participe à diverses voies de signalisation impliquées dans plusieurs pathologies. L'interaction de Pin1 avec SMRT phosphorylé par CDK2 au niveau de S1241 et S1469, diminue sa stabilité affectant la répression transcriptionnelle SMRT-dépendante des autres facteurs de transcription (388). Pin1 agit aussi sur les suppresseurs tumoraux de la famille FOXO. Le stress oxydatif induisant la liaison de Pin1 à FOXO4 phosphorylé, provoque la

déubiquitination de FOXO4 ce qui inhibe sa translocation nucléaire et par le même effet, diminue son activité transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (389, 390). Le suppresseur tumoral PML (Promyelocytic leukemia protein) impliqué dans la régulation de l'apoptose, l'infection virale, la sénescence et le cycle cellulaire, est aussi régulé par Pin1 qui diminue la stabilité de PML à travers les résidus S403, S505, S518 et S527. Par contre, la SUMOylation de PML bloque l'interaction entre Pin1 et PML, empêchant ainsi la dégradation de PML (391). RUNX3 fonctionnant comme un suppresseur tumoral, est fréquemment supprimé ou inhibé transcriptionnellement dans les cancers. Pin1 interagit avec quatre motifs Ser/Thr-Pro phosphorylés (T209, T212, T231 et S214) dans RUNX3 via son domaine WW, ce qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation par protéasome de RUNX3 et la suppression de son activité transcriptionnelle (392). En ce qui concerne le suppresseur de tumeur p53, Pin1 interagit avec p53 à travers les motifs T76-P et T86-P mais l'isomérisation au niveau de ces motifs n'est pas déterminante dans l'activité transcriptionnelle de p53. Cependant, en réponse à l'altération de l'ADN, Pin1 interagit avec p53 au niveau des résidus pS33, pT81 et pS315 provoquant des changements conformationnels dans p53 stimulant sa liaison à l'ADN. De plus, les cellules déficientes en Pin1 sont défectueuses dans l'activation de p53 (393, 394).

4.2.2.4. Les récepteurs nucléaires

La régulation des récepteurs nucléaires se fait souvent par phosphorylation. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés dans les récepteurs nucléaires. Cependant, jusqu'à la découverte de Pin1, la phosphorylation sur les motifs Ser/Thr-Pro était inconnue (395). Ce sont principalement les CDK (Cyclin-dependent kinases) et les MAPK qui dirigent la phosphorylation des résidus prolines au niveau des récepteurs nucléaires (396). Alors que les

récepteurs nucléaires ER α (397), AR (398), Nur77, Nurr1 et NOR-1 (399, 400) sont activés par Pin1 dans le cancer du sein, le cancer de la prostate et durant la mitogenèse respectivement, RAR α (401, 402) et PPAR γ (403) sont inhibés par Pin-1 dans les cellules leucémiques myéloïdes aiguës et dans les macrophages, respectivement.

4.2.2.4.1. Régulation de ER α par Pin1

Comme discuté dans la section 2.1.1, le domaine AF-1 de ER α peut être phosphorylé par les kinases menant à l'activation du récepteur indépendamment du ligand. La sérine-118, le site de phosphorylation le plus important dans ER α avait été identifié, comme étant critique pour la liaison de Pin1 dont la mutation en alanine empêche cette association, par les travaux de Rajbhandari et al. (397). Cette étude a démontré que la surexpression de Pin1 favorise l'activité de ER α induite par l'estrogène et par le tamoxifène, et que l'expression de Pin1 corrèle avec la prolifération des tumeurs mammaires, fournissant une voie qui peut aider à comprendre le mécanisme de résistance à la thérapie hormonale. Pour appuyer leur découverte, Rajbhandari et al., ont pu mener une autre étude pour fournir un mécanisme approfondis de la régulation de ER α par Pin1. En fait, l'isomérisation cis-trans de la liaison pS118-P119 par Pin1 stabilise l'activité transcriptionnelle de ER α en inhibant la dégradation du récepteur dépendante du protéasome. Plus précisément, l'isomérisation du récepteur perturbe son ubiquitination car elle interfère avec les interactions du récepteur avec E3, E6AP inférant que Pin1 régule ER α post-traductionnellement dans le cancer de sein (404).

4.3. Pin1 dans le développement du cancer de sein

Au cours du développement, Pin1 est impliqué dans le développement du tissu mammaire. Le rôle physiologique de Pin1 avait été démontré par des souris KO en Pin1. Bien que ces souris soient viables et atteignent l'âge adulte, elles présentent une déficience de l'épithélium mammaire et des cellules souches mammaires (381) avec une capacité d'auto-renouvellement réduite démontrée par des tests *in vitro* et *in vivo* (405, 406). Cycline D1 semble être le déterminant de la fonction de Pin1 chez ces souris, car les niveaux de cycline D1 diminuent dans ces modèles déficients en Pin1 (381). Tout compte fait, comme discuté dans la section 4.2.2.2, Pin1 régule positivement la fonction de cycline D1, soutenant l'importance de l'interaction Pin1-Cycline D1 dans le développement des glandes mammaires (407).

En dépit de son implication physiologique, Pin1 a aussi des rôles critiques dans le développement et la progression du cancer de sein et ce, dans les principaux processus cellulaires du développement et de la progression de la maladie (371, 387, 405-412). Effectivement, Pin1 est surexprimé dans la majorité des cancers de sein et cette surexpression corrèle avec un mauvais pronostic (406, 408, 409, 411, 413, 414). L'expression du gène Pin1 est régulée à la hausse dans le cancer du sein par les facteurs de transcription E2F 16 à travers les voies ErBb2 / HER2 / Neu, Ras et IGF-1R (371, 412). En fait, alors que les cellules épithéliales mammaires normales expriment de faibles niveaux de Pin1, les cellules cancéreuses mammaires présentent des niveaux fortement élevés de Pin1 phosphorylé. D'ailleurs, c'est la phosphorylation de Pin1 qui l'active, le stabilise et induit sa liaison au substrat qui est à l'origine de son activité (415). Pin1 est impliqué dans le maintien de la prolifération cellulaire cancéreuse du sein car il régule plusieurs protéines essentielles pour le cycle cellulaire et la mitose. À cette

fin, dans les cellules cancéreuses, Pin1 interagit avec pRB, hyper-phosphorylé par CDK, déclenchant la prolifération cellulaire (416). L'amplification du centrosome, durant le cycle cellulaire, menant à l'instabilité du chromosome est un mécanisme qui caractérise les cellules cancéreuses et constitue un mauvais pronostic. Au cours du cycle cellulaire, Pin1 joue un rôle dans la duplication du centrosome en coordonnant entre l'ADN et la synthèse centrosomale. Cependant, la surexpression de Pin1 induit une amplification du centrosome anormale causant une mauvaise ségrégation des chromosomes et conduisant à l'aneuploïdie et à la transformation oncogénique, comme le montrent les souris MMTV-PIN1 et les cellules cancéreuses mammaires humaines (417-419). Au niveau métastatique, Pin1 suscite la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du sein. La surexpression de Pin1 favorise les transitions épithéliales mésenchymateuses en régulant négativement E-cadhérine dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses (405, 406, 414). De plus, les niveaux des autres marqueurs mésenchymateux N-cadhérine et Vimentine ainsi que l'activité transcriptionnelle de la protéine Snail, dépendent de la surexpression de Pin1 à travers les voies PI3K-Akt, NF- κ B ou Notch1 (420). En plus de son implication dans le développement de la pathologie, Pin1 est un médiateur dans la résistance thérapeutique. Dans les tumeurs ER+, Pin1 confère une résistance au traitement par l'induction d'EMT, d'angiogenèse (421, 422) et par la dégradation de CDK10 (423). Par ailleurs, Pin1 orchestre la résistance en maintenant des niveaux élevés de ER α (397, 404).

Hypothèses et objectifs

Tout comme l'estrogène et ses récepteurs, les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle essentiel dans la tumorigénèse et la métastase de plusieurs cancers, notamment dans le cancer du sein et le cancer épithélial de l'ovaire. Nous avons préalablement publié un article dont les résultats démontrent un couplage fonctionnel entre l'estrogène et les chimiokines dans le cancer du sein. Dans ce contexte, l'ARNm de la chimiokine SDF-1 est induit par les estrogènes conduisant à une boucle de régulation autocrine/paracrine qui rend le cancer du sein plus agressif. CXCR7 et ses deux ligands SDF-1 et I-TAC ont été détectés dans le cancer de l'ovaire (424) et l'axe SDF-1/CXCR7 avait été établi dans le cancer de l'ovaire (351). Toutefois, le mécanisme de régulation du récepteur CXCR7 ou encore les chimiokines SDF-1 et I-TAC reste inconnu dans le cancer de l'ovaire. L'implication des récepteurs aux estrogènes dans le cancer de l'ovaire avait été établie. Toutefois, la pathologie est plus liée à l'isoforme ER α que ER β , car de nombreuses études ont démontré que ER β est fortement représenté dans les cellules ovariennes épithéliales normales ou les tumeurs bénignes (425-428), alors que ER α est la forme principale exprimée dans les tumeurs malignes (426). Le fait que CXCR7 soit un deuxième récepteur pour SDF-1 suggère que CXCR7 pourrait avoir un rôle potentiel dans la tumorigénèse médiée par les estrogènes. Dans cette étude, notre hypothèse était que CXCR7 est un gène cible des estrogènes et que l'expression de CXCR7 est positivement régulée par ER α dans le cancer épithélial de l'ovaire. **Les objectifs sont :**

- 1. Investiguer le mécanisme de régulation du gène CXCR7 par le récepteur de l'estrogène ER α dans le cancer de l'ovaire.**
- 2. Identifier le rôle de CXCR7 dans le cancer de l'ovaire.**

Étant des facteurs de transcription, les récepteurs aux estrogènes régulent une panoplie de gènes cibles impliqués dans la tumorigenèse. La régulation génique par les récepteurs aux estrogènes dépend de la nature du ligand, le recrutement des cofacteurs et les modifications postraductionnelles. Les isoformes ER α et ER β partagent plusieurs caractéristiques structurales qui font converger leurs mécanismes de signalisation, comme par exemple les résidus phosphorylés dans le domaine AF-1 qui sont responsables de l'activation ligand-indépendante des récepteurs. L'isomérisation induite par Pin1 après la phosphorylation provoque des changements conformationnels qui peuvent affecter les propriétés des protéines substrats de Pin1(15, 19). Dans le cancer du sein, Pin1 confère un potentiel de prolifération accru aux cellules cancéreuse en ciblant et en isomérisant ER α à pS118-P119 (26). Dans le cancer du sein, ER α est généralement considéré comme un marqueur pronostique. Cependant, en ce qui concerne ER β , sa tumorigenèse est encore discutée (9). Nous avons identifié la Ser-87 comme cible des kinases dans ER β , qui est hautement phosphorylée par SDF-1. Le fait que le domaine AF-1 de ER β contient la Ser-87 hautement phosphorylé et que laSer-87 appartient au motif Ser/Thr-Pro, soulève la possibilité que ER β puisse être une cible de Pin1. Dans cette étude, notre hypothèse était que ER β est un substrat pour Pin1 et que la phosphorylation de la sérine-87 est impliqué dans la régulation de ER β par Pin1. Les objectifs sont :

- 3. Caractériser le mécanisme par lequel Pin1 régule l'activité transcriptionnelle de ER β .**
- 4. Évaluer l'impact de cette régulation dans le cancer du sein.**

De par les objectifs fixés pour cette thèse, nous étudierons les facteurs qui interagissent avec les récepteurs aux estrogènes et qui donnent un caractère plus agressif aux cellules cancéreuses ovariennes et mammaires. Élucider ces mécanismes, pourrait ouvrir des voies potentielles pour apporter de nouveaux éléments aux phénomènes de résistance à la thérapie endocrinienne dans le cancer du sein et de l’ovaire. Étant donné la capacité transcriptionnelle élevée de ER α à réguler l’expression de plusieurs gènes impliqués dans la tumorigénèse, et puisque ER α est dominant dans le cancer de l’ovaire, nous voulons investiguer la régulation de CXCR7 par ER α . D’autre part, comme le rôle de ER α dans la résistance à la thérapie dans le cancer du sein est déjà confirmée dans plusieurs études et aussi en clinique, nous voulons étudier l’activité et le rôle de ER β en présence de Pin1 dans le cancer du sein. Atteindre les objectifs mentionnés ici, apportera de nouveaux éléments à la compréhension du rôle de chaque isoformes dans les cancers gynécologiques.

Chapitre 2: Résultats

1^{ère} publication

Feedback control of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis by estrogen receptor α in ovarian cancer

Samira Benhadjeba^{1,2}, Lydia Edjekouane^{1,2}, Karine Sauvé^{1,2}, Euridice Carmona³ and
André Tremblay^{1,2,4,5}

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³CHUM Research Center, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, H2X 0A9 Canada

⁴Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, University of Montreal, Saint Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

⁵Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

Running title: Ovarian CXCR7-ER α interplay

Abbreviations

ECM: Extracellular matrix; EMT: epithelial-mesenchymal transition; GSEA: Gene set enrichment analysis; OC: Ovarian cancer; SNAI1: Snail family zinc finger 1; SNAI2: Snail family zinc finger 2; TCGA: The Cancer Genome Atlas.

Keywords. Chemokine receptors; CXCR7; ACKR3; estrogen receptors; NR3A1; SDF-1; CXCL12; I-TAC; CXCL11; Ovarian cancer; EMT; stromal cells; mesenchymal subtype

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca

Abstract

Ovarian cancer is one of the most intractable diseases, exhibiting tremendous molecular heterogeneity and lacking reliable methods for screening, resulting in late diagnosis and widespread peritoneal dissemination. Menopausal estrogen replacement therapy is a well-recognized risk factor for ovarian cancer, but little is known about how estrogen might contribute to this disease at the cellular level. This study identifies chemokine receptor CXCR7/ACKR3 as an estrogen-responsive gene, whose expression is markedly enhanced by estrogen through direct recruitment of ER α and transcriptional active histone modifications in ovarian cancer cells. The gene encoding CXCR7 chemokine ligand I-TAC/CXCL11 was also upregulated by estrogen, resulting in Ser-118 phosphorylation, activation, and recruitment of estrogen receptor ER α at the CXCR7 promoter locus for positive feedback regulation. Both CXCR7 and CXCL11, but not CXCR3 (also recognized to interact with CXCL11), were found to be significantly increased in stromal sections of microdissected tumors, and positively correlated in mesenchymal subtype of ovarian cancer. Estrogenic induction of mesenchymal markers SNAI1, SNAI2, and CDH2 expression, with a consequent increase in cancer cell migration, were shown to depend on CXCR7, indicating a key role for CXCR7 in mediating estrogen upregulation of mesenchymal markers to induce invasion of ovarian cancer cells. These findings identify a feed-forward mechanism that sustains activation of the CXCR7/CXCL11 axis under ER α control to induce the epithelial-mesenchymal transition pathway and metastatic behavior of ovarian cancer cells. Such interplay underlies the complex gene profile heterogeneity of ovarian cancer that promotes changes in tumor microenvironment and metastatic acquisition.

Introduction

Ovarian cancer (OC) is the most aggressive and deadliest of gynecologic malignancies, mainly because of its high metastatic potential and late diagnostic due to lack of early tumor biomarkers. Preclinical studies have shown that factors involved in development and progression of ovarian cancer include sex steroid hormones. Indeed, hormone replacement therapy based on exogenous estrogen given to postmenopausal women increases their risk to develop ovarian cancer (Beral *et al.*, 2007; La Vecchia, 2017; Malvezzi *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2008). Estrogens are well known to be oncogenic in breast cancer by regulating numerous genes involved in development, proliferation, and progression of the disease. Gene regulation by estrogen is mediated by the estrogen receptors ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2), members of the nuclear receptor family of transcription factors (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Upon estrogen binding, the ERs initiate transcription by directly binding to estrogen response elements (ERE) contained in target genes promoters. ER α is expressed in up to 60% of ovarian epithelial tumors with higher levels compared to normal ovaries although its prognostic value remains uncertain (Chan *et al.*, 2008; Hildebrand *et al.*, 2010; Sieh *et al.*, 2013). Despite also a high expression of ER β in ovarian cancer, its significance in terms of tumor subtypes and isoform specificity is variable (Ciucci *et al.*, 2014; Kyriakidis and Papaioannidou, 2016).

The progression of ovarian cancer towards angiogenic and metastatic stages has been associated in part with chemokine signaling pathways. Stromal-derived factor SDF-1 (CXCL12) and its G-protein-coupled receptor CXCR4 are highly expressed in ovarian cancer and associated with poor outcome (Guo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Popple *et al.*, 2012). The recent identification of CXCR7 (ACKR3) as a second receptor for SDF-1 has made essential to re-evaluate the response to SDF-1 in pathophysiology (Balabanian *et al.*, 2005). In addition, CXCR7 is also activated by

interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant I-TAC (CXCL11), adding to the complexity of CXCR7 cellular responses (Burns *et al.*, 2006). CXCR7 is expressed in the hematopoietic system, heart, vascular endothelial cells, bone, kidney, and brain, and plays a pivotal role in cell growth, survival, and migration (Burns *et al.*, 2006; Sanchez-Martin *et al.*, 2013; Thelen and Thelen, 2008). Several studies have implicated a tumorigenic role of CXCR7 in various cancers, including breast, lung, and prostate, with increased growth, migration potential, and prognostic significance (Miao *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). Conversely, CXCR7 expression does not always correlate with poor outcomes, such as in neuroblastoma and colon cancer (Heckmann *et al.*, 2014; Liberman *et al.*, 2012), suggesting context-dependent actions of CXCR7. However, the role of CXCR7 in ovarian cancer is less characterized. CXCR7 expression was identified in neoplastic ovaries (Jaszczynska-Nowinka *et al.*, 2014) and ligand-activation of CXCR7 was shown to induce matrix metalloproteinase MMP-9 in epithelial ovarian cancer cells (Yu *et al.*, 2014). In addition, CXCL11 and CXCL12 expression levels were found augmented in ovarian carcinomas compared to normal ovaries (Furuya *et al.*, 2007; Jaszczynska-Nowinka *et al.*, 2014). However, the signaling events regulating gene expression of CXCR7 and its ligands in ovarian cancer cells remain unknown.

Previous findings have identified estrogen as a positive regulator of the CXCL12/SDF-1 gene in breast cancer cells (Hall and Korach, 2003; Sauve *et al.*, 2009), and we have described that such regulation is part of a positive autocrine feedback loop involving CXCR4 and estrogen receptors to promote cell growth (Sauve *et al.*, 2009). In this study, we identified CXCR7 as an estrogen-responsive gene; whose expression is specifically enhanced in ER-positive ovarian cancer cells through direct recruitment of ER α and favorable chromatin modifications at the CXCR7 promoter. We also show that I-TAC/CXCL11 expression is enhanced by estrogen, resulting in

phosphorylation of ER α and feedback regulation of the CXCR7 gene. Our findings identify a regulatory loop between ER α and CXCR7 chemokine axis, promoting optimal response to estrogen and invasion phenotype to ovarian cancer cells.

Materials and methods

Cell culture and treatments

Human ovarian cancer OVCAR-3 and SKOV-3 cells, human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells, and human endometrial cancer HEC-1A and Ishikawa were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent Inc.). Human epithelial ovarian cancer TOV21G cells were derived from clear cell carcinoma and cultured in OSE medium supplemented with 10% FBS (Yoffou *et al.*, 2011). TOV2295 and TOV3133G cell lines were derived from high-grade serous carcinomas and cultured as described (Letourneau *et al.*, 2012). Prior to treatments, cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with dextran-coated charcoal-treated FBS. Cells were treated with 17 β -estradiol (E2) and ICI 182,780 obtained from Sigma, I-TAC and SDF-1 from Cell Sciences Inc., and specific agonist propylpyrazole-triol (PPT) for ER α and diarylpropionitrile (DPN) for ER β obtained from Tocris.

RNA isolation and quantitative PCR

Total RNA was extracted from cells and complementary DNA was prepared and subjected to real-time PCR as described (Rodrigue-Way *et al.*, 2014). Values are derived from at least three

separate experiments performed in triplicate and normalized to ribosomal protein RPLP0 or to β -actin expression.

Western blot analysis

Cells were harvested and immunoblotting was performed as described (Sanchez *et al.*, 2013).

Antibodies for ER α , ER α -pSer118, pErk1/2, and Erk1/2 were from Cell Signaling, and ER β and EMT markers from Santa Cruz Biotech. In each experiment, total protein loading was normalized using an anti- β -actin antibody (Novus Biologicals).

GEO and TCGA gene expression data

Gene expression data (GSE40595, GSE38666, and GSE9890 profiles) were retrieved as raw signals from GEO datasets (www.ncbi.nlm.nih.gov/gds), analyzed and log₂ scaled using the GEO2R online analysis tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r). Correlation and distribution analysis was performed in human ovarian cancer samples using data from the Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort. Expression data were retrieved from the cBioportal for Cancer Genomics (www.cbioportal.org) using the high-grade serous ovarian cancer dataset (Cancer Genome Atlas Research, 2011). Stratification into the various OC subtypes was based on specific gene signature of the TCGA dataset (Bell *et al.*, 2011; Konecny *et al.*, 2014). Gene expression was normalized to the distribution of each gene in tumors and annotated as z-scores as described (Edjekouane *et al.*, 2016). The mesenchymal signature score was derived from a subset of overlapping genes from the TCGA mesenchymal OC subtype and the Tothill C1 (tumor desmoplasia) subtype

samples that were positively correlated with mesenchymal markers and extracellular matrix (ECM) remodeling (Verhaak *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Graph Pad Prism 6 was used to perform Pearson correlation test (two-tailed) and significance was set at $P < 0.05$.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were performed as described (Edjekouane *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2013; Sauve *et al.*, 2009). Cells were treated with vehicle (ethanol), 10 nM estradiol or 50 nM I-TAC for 45 min and chromatin was harvested and analyzed by ChIP-qPCR using antibodies as described (Edjekouane *et al.*, 2016). Preimmune IgG was used as a negative control. Each analysis was performed in duplicates and results are derived from at least three independent ChIP experiments.

ChIP-seq analysis

The ChIP-seq data were generated and processed as previously described (Edjekouane *et al.*, 2016) with the sequenced reads aligned against the human reference genome hg38 and visualized with IGV. ER α ChIP-seq data from Ishikawa cells were obtained from the ENCODE consortium (ENCSR000BIY).

CXCR7 promoter constructs and mutagenesis

The CXCR7 proximal promoter regions were amplified by PCR according to GenBank sequence of the CXCR7/ACKR3 gene contig (NT_005120) and the UCSC hg38 genome assembly. Amplified fragments corresponding to proximal P1 (2610bp) upstream from the transcriptional

start site, and P2 promoter (2532bp) located in intron 1 were inserted in front of the luciferase coding region in pBLuc plasmid as described (Sanchez *et al.*, 2013). P2 truncated fragments were generated by restriction digest with Pst1 (P2 Δ 1) and HindIII (P2 Δ 2). Site-directed mutagenesis of the ERE-42463 was performed by PCR. All constructs were validated using automated sequencing.

Transfection and luciferase reporter assay

Transfection of cells and luciferase assays were performed as described (Picard *et al.*, 2012). Treatments were usually for 16 h otherwise stated. Cells were then harvested in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100 and lysates analyzed for luciferase activity using a plate reader (Perkin-Elmer). Luciferase values were normalized for transfection efficiency to β -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared with controls. Data were derived from at least three independent experiments performed in triplicates.

RNA interference

CXCR7 knockdown was performed by infecting OVCAR-3 cells with shRNA-carrying lentiviral particles as described (Rodrigue-Way *et al.*, 2014). Flow cytometry sorting was performed to select cells stably transduced with lentivirus targeting CXCR7 (sh-CXCR7) and compared to shRNA negative control (shCtl). Two independent shCXCR7 cell lines were generated using CXCR7 targeted sequences GCATCTCTTCGACTACTCAGA and CGCTCTCCTTCATTTACATTT. Efficient knockdown was monitored by quantitative RT-PCR and Western blot analysis.

Cell migration assay

OVCAR-3 cells were seeded (10^5 cells/well) and when 80–90% confluence was reached, linear wounds were made using a sterile 10 μ l pipette tip. Cells were rinsed with PBS and treated with 10 nM E2 or vehicle (EtOH) freshly added every 24hrs in culture medium. Wound images were then recorded over a period of 48hrs and wound closure area was measured using ImageJ software. Data were calculated as % wound healed vs. 0 h derived from duplicate wells for each condition obtained from three independent experiments.

Statistical analyses

Values are expressed as the means \pm SEM (standard error of the mean), derived from at least three independent experiments performed in triplicates. Single comparisons between two groups were determined by Student's t-test. Comparisons between multiple groups were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test. P values <0.05 were considered significant.

Results

CXCR7 is strongly expressed in human ovarian cancer cells and tumor stroma

To investigate the expression pattern of CXCR7 in reproductive cancer cells, we tested a subset of cancer cell lines derived from human uterine, ovary and breast tumors. High levels of CXCR7 mRNA were found in ovarian SKOV-3 and OVCAR-3 cancer cells, and in breast MCF-7 cancer

cells, and to a lesser extent in uterine Ishikawa cells, compared to the other cell lines which exhibit very low expression levels (Fig. 1A). The CXCR7 expression pattern strikingly correlates with the ER α status of cells with elevated ER α protein levels found in OVCAR-3, MCF-7, and Ishikawa cells, in contrast to HEC-1A, TOV21G and MDA-MB-231 cells (Fig. S1A). SKOV-3 cells exhibit low levels of ER α , but these cells have been described as not having a functional ER α (Lau *et al.*, 1999), which might suggest that high levels of CXCR7 might be independent of ER α . To further define the expression pattern of CXCR7 in epithelial ovarian cancer, we next analyzed a microdissected profile of human isolated surface epithelium ovarian tumors and a matched set of surrounding cancer stroma. We found a significantly higher expression of CXCR7 in tumor stroma sections when compared to normal stroma or to tumor epithelium compartments (Fig. 1B). Further validation of increased stromal CXCR7 was also provided in two other independent profiling datasets of ovarian cancer (Fig. 1C and Fig. S1B). In addition, analysis of stratified subtypes of ovarian cancer based on specific gene signature of the TCGA dataset (Bell *et al.*, 2011; Konecny *et al.*, 2014) indicates a significant increase in CXCR7 gene expression in the mesenchymal and proliferative subtypes (Fig. 1D). These data demonstrate a context-specific expression of CXCR7 in ovarian cancer.

CXCR7 expression is strongly upregulated by estrogen in ER α -positive ovarian cancer cells

Given the correlation with ER α expression, we found elevated ESR1 levels in both ovarian tumor stroma and epithelial compartments compared to their respective normal counterparts (Fig. 1E and Fig. S1C). We thus addressed whether CXCR7 gene was under estrogenic regulation by treating ovarian cancer cells with 17 β -estradiol (E2). OVCAR-3 cells showed a significant induction of

CXCR7 expression levels in response to E2, reaching a near 7-fold increase compared to untreated cells (Fig.1F). However, CXCR7 was not regulated by E2 in ER α -negative TOV21G cells and in ER α -defective SKOV-3 cells, consistent with the requirement of a functional ER α . As a control, ER α -positive cells exhibit a functional response to E2 with increased expression of progesterone receptor (PGR), a known target gene of ER α (Fig. S1D). These results identify CXCR7 as an estrogenic regulated gene in ovarian cancer cells.

ER α mediates the estrogenic induction of the CXCR7 gene

Considering that OVCAR-3 cells do express both ER α and ER β isoforms, and that expression of the ESR2 (ER β) gene was also found elevated in microdissected ovarian tumor stroma compared to normal sections (Fig. S2A), we thus analyzed the respective contribution of ER α and ER β in regulating CXCR7 gene in ovarian cancer cells. Using ER selective agonists able to upregulate ER target gene expression (Fig. S2B), we found that only the ER α agonist propylpyrazole-triol (PPT), and not the ER β agonist diarylpropionitrile (DPN), significantly induced CXCR7 expression in OVCAR-3 cells (Fig. 2A). In addition, treatment of cells with the ER antagonist ICI 182,780 (also referred to as fulvestrant), which promotes ER degradation, led to a decrease in CXCR7 gene expression. To further ascertain the required role of ER α , the stable expression of ER α in ER-negative ovarian TOV21G cells (Fig. S2C) conferred a near 14-fold upregulation of CXCR7 in response to E2 as compared to mock-stable control cells (Fig. 2B). In comparison with ER α , ER β was far less effective in inducing CXCR7 expression in stable cells (Fig. 2B and

S2D). These results demonstrate the predominant role of ER α in mediating the upregulation of CXCR7 expression by estrogen in OVCAR-3 cells.

Components of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis are regulated by estrogen and correlate with OC mesenchymal subtype

Chemokine receptors are known to exhibit pleiotropic and redundant responses to specific chemokine ligands, defining various and complex activation pathways. SDF-1/CXCL12 chemokine shares interaction with CXCR4 and CXCR7 receptors, whereas I-TAC/CXCL11 can bind to CXCR7 and CXCR3 receptors. We thus addressed whether these various chemokine components were also regulated by estrogen in OVCAR-3 cells. I-TAC/CXCL11 expression was found significantly induced by E2, whereas CXCR4, CXCL12, and CXCR3 remained mostly unaffected in OVCAR-3 cells, suggesting that genes of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis were preferably upregulated by estrogen compared to CXCR4/CXCL12 axis components (Fig. 2C). Using ER α -positive TOV2295 and TOV3133G cells generated from human ovarian carcinomas (Letourneau *et al.*, 2012), we also found a similar expression profile with the upregulation of CXCR7 and CXCL11 in response to estrogen, which further validates the distinct regulation in OC cells (Fig. 2D). As for CXCR7, CXCL11 was also significantly elevated in ovarian tumor stroma compared to normal sections (Fig. 2E), while stromal CXCR3 expression was not (Fig. S2E and S2F), emphasizing a selective contribution of the CXCR7/CXCL11 axis. Consistent with such positive relation, CXCR7 expression was significantly correlated with that of CXCL11 in the mesenchymal subtype of ovarian tumors (Fig. 2F). Interestingly, when performing a similar Pearson analysis using the other three OC subtypes from the TCGA dataset,

no significant correlation could be found between CXCR7 and CXCL11 levels (Fig. S3A-C), implying a positive CXCR7/CXCL11 relation only in the mesenchymal cluster of OC. Given their respective regulation by estrogen, this suggests a context-dependent regulation of the CXCR7/CXCL11 axis components in ovarian cancer.

Identification of functional EREs and favorable active chromatin landscape at the CXCR7 locus

Estrogen responsiveness of target genes is mostly mediated through binding of ERs to estrogen responsive elements (ERE). Given the prominent role of ER α in CXCR7 upregulation, we then performed analysis using our ER α ChIP-seq data (Edjekouane *et al.*, 2016) in comparison with available data obtained in Ishikawa cells (Encode) and sequence screening of consensus EREs, in order to identify putative ER α binding sites in the vicinity of the CXCR7 gene. Sequence analysis has revealed several putative EREs within the CXCR7 gene and also at more distal locations, among which ERE-32562 resides upstream of 5'-UTR containing exon 1 in the proximal promoter region of CXCR7, and ERE-42463 and ERE-43192 are located in the first intron upstream of the coding exon 2 (Fig. 3A). Standard ChIP validation revealed that the ERE-42463 was by far the most potent in recruiting ER α with a more than 52-fold increase in OVCAR-3 cells treated with E2 compared to control, whereas a 3 to 5-fold response was observed for the other EREs tested (Fig. 3B). To further distinguish between active and inactive EREs, we performed ChIP for transcriptionally active histone H3K27ac marks and inactive H3K27me3 marks at each respective ERE. We found a strong enrichment of H3K27ac mark in response to E2 at the ERE-42463, whereas the H3K27me3 mark was reduced (Fig. 3B),

suggesting that estrogen induces a favorable environment for active transcription at the ERE-42463 in ovarian cancer cells. Such enrichment of H3K27ac mark is also indicative of estrogenic regulation of the PGR promoter (Fig. S4). In contrast, our ChIP-seq data indicates ERE-42463 as a very weak ER α recruiting site in MCF-7 cells (Fig. 3A), supporting a selective and context-dependent role of the ERE-42463 in ovarian cancer cells. As for the other EREs tested, lower levels of active chromatin marks were found in response to E2, although a reduction of H3K27me3 mark was observed at the ERE-76380, suggesting a less active but functional ERE to mediate distal estrogenic regulation of CXCR7 (Fig. 3A and B). Although highly variable, ER β was less recruited to the ERE-42463 compared to ER α (Fig. 3B), supporting an ER isoform-specific preference of recruitment. These results demonstrate a direct role of ER α in interacting with CXCR7 promoter in response to estrogen, which triggers an active chromatin landscape as part of the mechanism responsible to enhance CXCR7 expression in ovarian cancer cells.

We next addressed the functional role of CXCR7 EREs in mediating E2-induced transcription using luciferase assay. We observed that the region flanking exon 1 of CXCR7 (hereby termed P1 promoter) was not responsive to estrogen in ER α -expressing 293 cells and OVCAR-3 cells, consistent with the inactivity of ERE-32562 (Fig. 3C). However, the region of intron 1 (termed P2) which contains ERE-42463 and ERE-43192 was highly responsive to estrogen in both cell types. In addition, truncation analysis and site-directed mutagenesis revealed that the ERE-42463 was required to promote estrogenic response of the P2 promoter region (Fig. 3C). These data identify a functional ERE in the P2 promoter of the CXCR7 gene, which is critical to mediate estrogen-induced transcriptional upregulation of CXCR7 expression in ovarian cancer cells.

CXCR7 activation enhances the transcriptional activity of ER α

In line with the upregulation of CXCR7 and CXCL11 by ER α , we next determined whether CXCR7 activation and signaling could regulate ER transcriptional response in a feedback control fashion. We found that the estrogen-induced activation of ER α in OVCAR-3 cells was better potentiated in the presence of CXCR7 agonists SDF-1 and I-TAC, supporting a role of CXCR7 activation on ERE-driven P2 reporter activity (Fig. 4A). Consistent with this, CXCR7 knockdown strongly impaired the response to SDF-1 and I-TAC, but also that of estradiol on ER α activity, indicating the requirement of CXCR7 to achieve an optimal response of the P2 promoter to estrogen. In addition, ectopic expression of CXCR7 in 293 cells also potentiated ER α activation by estradiol, which was further enhanced with SDF-1 treatment (Fig. S5). Such enhancement of estrogenic response by CXCR7 also had an impact on target gene expression with significant impairment in the increase of PGR and CXCL11 gene expression to estrogen in conditions of CXCR7 depletion (Fig. 4B). These results suggest that the CXCR7 activation pathway contributes to ER α transcriptional competence in ovarian cancer cells.

Ser-118 phosphorylation mediates ER α response to CXCR7 activation

In order to determine how CXCR7 can modulate ER α activity, we tested the possibility that CXCR7 signaling might promote ER α phosphorylation. Phosphorylation of ER α is known to directly affect its transcriptional potential with ER α Ser-118 being considered a major site of phosphorylation in response to estrogen and Erk activation (Sanchez *et al.*, 2010; Weigel and Moore, 2007). We found that phosphorylation of ER α at Ser-118 was increased in response to

CXCR7 activation with I-TAC, concomitant with increased Erk1/2 activation in 293 cells (Fig. 5A). Also, the phosphorylation of Ser-118 normally triggered by E2 was strongly impaired by CXCR7 knockdown in OVCAR-3 cells (Fig. 5B). Maximal ER α transcriptional response to CXCR7 activation also required Ser-118, as the S118A mutation significantly reduced ER α transcriptional response to I-TAC (Fig. 5C). In addition, I-TAC potently increased the enrichment of phosphorylated Ser-118 ER α at the ERE-42463 of the CXCR7 P2 promoter in ChIP assay, supporting a mechanism of ER α recruitment to upregulate CXCR7 expression in OVCAR-3 cells (Fig. 5D). These findings identify Ser-118 as a targeted site of CXCR7 signaling pathway, resulting in ER α phosphorylation and activation that contributes to enhancing CXCR7 expression in a positive feedback manner.

CXCR7 and CXCL11 positively correlate with the mesenchymal pattern in ovarian tumors

Our gene set enrichment analysis (GSEA) of microdissected profiles and TCGA variant subtypes revealed an enriched expression of CXCR7 in the stromal compartment of ovarian tumors. We have defined the correlation analysis of CXCR7 gene expression against a gene stromal signature that was built from overlapping genes of mesenchymal markers and extracellular matrix (ECM) remodeling derived from the TCGA mesenchymal subtype and the Tothill C1 (tumor desmoplasia) datasets (Verhaak *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). The signature was discriminately expressed in the different ovarian cancer subtypes with a significant enrichment in the mesenchymal subtype (Fig. S6A). When compared to CXCR7 expression, a positive correlation with the signature score was found using Pearson analysis in

all OC subtypes of the TCGA dataset ($r=0.32$; Fig. 6A). Supporting this, CXCR7 levels positively correlated with classic ECM and reactive stromal cell markers (Fig. S6B). CXCL11 levels were also correlated with the stroma score although to a lesser extent ($r=0.14$), largely owing to the fact that the only significant rates were observed in the mesenchymal and differentiated subtypes (Fig. S6C), thereby supporting a more context-dependent effect for CXCL11. To further validate their possible contribution to OC mesenchymal subtype, we found that both CXCR7 and CXCL11 strongly correlate with genes associated with ECM and OC invasion, such as PRRX1, TMEM45A, and CTSK, when analyzed in the mesenchymal counterpart of ovarian tumors (Fig. S7). This suggests a prominent role of the CXCR7/CXCL11 axis in the mesenchymal subtype which strongly correlates with the stromal characteristics of tumors.

CXCR7 is required to increase the migration potential of ovarian cancer cells to estrogen

The positive relation of CXCR7 with several components of reactive stromal cells and invasive tumor cells do suggest a role for CXCR7 to affect OC cell migration. We thus addressed whether CXCR7 regulation of estrogenic response exerts a functional impact on ovarian cancer cell mobility. An increased migration of OVCAR-3 cells was observed in response to estrogen when compared to untreated cells, reaching a near 70% of wound closure over 48 hrs of treatment (Fig. 6B and C). However, CXCR7 depletion strongly impaired the estrogenic potential of cells to migrate, suggesting that CXCR7 was required to promote maximal migration of OVCAR-3 cells. To support these findings, we analyzed the expression of classic epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker genes, such as the mesenchymal markers CDH2/N-cadherin,

SNAI1/Snail and SNAI2/Slug. Expression levels of these EMT genes were found positively correlated with CXCR7 in the whole TCGA dataset of OC subtypes (Fig. S8), implying a critical role of CXCR7 in mesenchymal transition phenotype. When treating OVCAR-3 cells, we found that estrogen markedly increased SNAI1/Snail protein and mRNA expression, with a concomitant reduction of CDH1 (Fig. 6D and E). These findings are consistent with the repressive effect of Snail transcription factor on CDH1/E-cadherin epithelial marker gene and support a transition toward a metastatic phenotype. Likewise, SNAI2/Slug and CDH2/N-cadherin expression levels were also increased by estrogen in these conditions. However, CXCR7 knockdown in OVCAR-3 cells mostly abolished the upregulation of SNAI1, SNAI2, and CDH2 expression by estrogen (Fig. 6D and E). These results indicate that CXCR7 expression is required to promote a mesenchymal transition phenotype to OVCAR-3 cells when exposed to estrogen, and support a feedback regulation of CXCR7 to activate the EMT pathway in ovarian cancer cells.

Discussion

Ovarian cancer is certainly one of the most intractable diseases, resulting in poor survival rates since most patients are asymptomatic until the disease has metastasized. Despite tremendous outcomes in our understanding of ovarian tumorigenesis, the exact mechanistic events that drive metastasis of ovarian tumor cells have not yet been well elucidated. Estrogen is a well-known risk factor for ovarian cancer progression and spread, but little is known about its contribution at the molecular level. This study identifies a mechanism by which CXCR7/ACKR3 gene is activated by estrogen, through the direct recruitment of ER α and favorable chromatin modifications in ovarian cancer cells. Estrogen also induces CXCL11 gene expression, resulting in a feedback regulation of ER α activation and CXCR7 gene transcription. This ER α -CXCR7 cross-regulation helps to promote an optimal response to estrogen and migration potential in ovarian cancer cells.

Recent studies have implicated CXCR7 overexpression with tumor aggressiveness and poor prognosis in a number of cancers, such as breast, prostate, and lung cancer (Iwakiri *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Wani *et al.*, 2014). However, the mechanism underlying such regulation of CXCR7 expression remains unclear. VEGF was shown to upregulate CXCR7 in human hepatocellular carcinoma cells (Zheng *et al.*, 2010), and IL-8 induced CXCR7 expression in prostate cancer cells (Singh and Lokeshwar, 2011). Though reports on the role of CXCR7 in ovarian cancer are more limited, activation of CXCR7 by SDF-1 was recently shown to promote ovarian cancer cell invasion (Yu *et al.*, 2014), whereas CXCR7 expression levels were found similar in normal and neoplastic ovaries (Jaszczynska-Nowinka *et al.*, 2014). Our data identify estrogen as an upstream signal and potent inducer of CXCR7 expression, through direct binding of ER α to the CXCR7 proximal promoter, thereby inducing favorable chromatin

activation and CXCR7 gene transcription. This identifies CXCR7 as an ER α target gene in ovarian cancer cells. Moreover, the increase also observed in CXCL11 expression defines the CXCR7/CXCL11 chemokine axis as an important pathway of ovarian cancer cell invasion regulated by estrogen. Estrogen replacement therapy is a strong risk factor for ovarian cancer in post-menopausal women, often resulting in aggressive dissemination and chemoresistance (Beral *et al.*, 2007; Kommoss *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2008). Our findings are consistent with such effect of exogenous estrogen and provide a mechanistic understanding of how cancer cells may exhibit metastatic behaviour triggered by the CXCR7 activation axis.

Redundancy in chemokine actions has complicated our understanding of specific pathways involved in tumorigenesis. Overexpression of the SDF-1/CXCL12 chemokine and its most recognized receptor CXCR4 has been associated with the progression phenotype of several epithelial cancers, including ovarian cancer (Figueras *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2014; Popple *et al.*, 2012). Besides interacting with SDF-1, CXCR7 activation by I-TAC is adding an additional layer of control to cell growth and adhesion properties (Balabanian *et al.*, 2005; Burns *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Here, we describe a selective increase in CXCR7 and CXCL11 gene expression in estrogen-treated ovarian cancer cells, compared to CXCR4, CXCL12, and CXCR3 genes, which remained largely unaffected. This suggests a primary role of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis in the response of ovarian cancer cells to estrogen, bringing selectivity in targeting the CXCR7 axis compared to other ER-positive gynecologic cancer cells, such as breast cancer cells which did not exhibit CXCR7 upregulation by estrogen (Boudot *et al.*, 2011). This specific regulation of CXCR7 and CXCL11 also correlates with data mining analysis, revealing enhanced expression levels of both genes in microdissected sections of OC stromal compartments as well as significant positive correlation rates in OC mesenchymal

subtype. In comparison, CXCR3 gene was not upregulated in human OC tumor subtypes and no significant changes were observed in response to estrogen in OC cells, implying a positive effect mainly associated with the CXCR7/CXCL11 axis. Given the upregulation of CXCR7 and CXCL11 expression by estrogen, our results suggest that exposure of ovarian cancer cells to estrogen might promote a favorable transition to transcriptional activation possibly of both genes, most likely by inducing preferred recruitment of ligand-bound ER α and modifications of chromatin marks, such as enrichment of H3K27ac and reduction of H3K27me3 marks. Although direct ER α binding and activating histone changes are shown to take place for CXCR7 gene upregulation by estrogen, it remains to be determined whether such modifications of promoter context also apply to mediate the estrogenic induction of the CXCL11 gene, given its positive response and enhanced expression.

Mostly based on studies in breast cancer cells, site-specific phosphorylation is known to regulate ER α transcriptional competence (Sanchez *et al.*, 2010; Weigel and Moore, 2007). Ser-118 is a major phosphorylation site implicated in the activation of ER α and clinical correlations have been established with resistance and survival of breast cancer patients (Chen *et al.*, 2013; Kok *et al.*, 2009; Yamashita *et al.*, 2008). Our findings indicate that Ser-118 is also a targeted site for ER α phosphorylation in ovarian cancer cells. Although the role of phosphorylated ER α in ovarian function and tumorigenesis is unknown, we identify CXCR7 as a signaling inducer of ER α Ser-118 phosphorylation through activation of Erk, leading to enhanced ER α transcriptional response to I-TAC ligand and recruitment at the CXCR7 promoter. With the increased expression of CXCR7 and CXCL11 in estrogen-treated cells, this suggests that Ser-118 phosphorylation is involved in a feed-forward mechanism to activate ER α and provide feedback regulation to the CXCR7/CXCL11 activation axis in ovarian cancer cells. ER β isoform is known to undergo

phosphorylation in response to CXCR4 activation, resulting in activation in breast cancer cells (Sanchez *et al.*, 2010; Sauve *et al.*, 2009). However, such response of ER β does not seem to occur in ovarian cancer cells, as suggested by the limited action of ER β to regulate CXCR7, its poor recruitment to CXCR7 gene, and its lack of correlation with CXCL11 in high serous ovarian tumors. Also consistent with this, a reduced expression of ER β has been reported in OC metastatic tumors (Bossard *et al.*, 2012; Kyriakidis and Papaioannidou, 2016).

Acquisition of mesenchymal features is observed in late-stage ovarian tumors, resulting in metastatic dissemination within the peritoneal cavity and poor clinical outcome. In particular, clinical studies have demonstrated that the EMT pathway, outlined by an increase in expression of SNAI1/Snail and SNAI2/Slug, two transcription factors that repress CDH1/E-cadherin gene, is associated with lower overall survival of ovarian cancer patients (Gallo *et al.*, 2010). In fact, in contrast to most carcinomas that dedifferentiate during neoplastic progression, epithelial ovarian carcinomas retain E-cadherin expression, thereby losing their stromal characteristics and promoting tumor progression at an early stage (Hudson *et al.*, 2008). It is the subsequent reacquisition of mesenchymal features with increased Snail and Slug and reduced E-cadherin that transforms primary lesions to late-stage tumors with peritoneal metastatic dissemination and shorter overall survival (Gallo *et al.*, 2010; Takai *et al.*, 2014). Our results indicate that such gene pattern can be triggered by estrogen in OC cells, with an upregulation of SNAI1/Snail and SNAI2/Slug expression, and downregulation of CDH1 gene, implying a switch to the mesenchymal phenotype. This is also consistent with the described effect of estrogen to induce metastatic potential of ovarian cancer cells (Jeon *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2008). Similarly, expression of CDH2/N-cadherin, also a mesenchymal marker, was increased in estrogen-treated OC cells. Interestingly, these changes of EMT markers were mostly dependent on CXCR7, as

depletion of CXCR7 strongly impaired their responses to estrogen. This suggests a key role for CXCR7 in mediating the estrogenic regulation of mesenchymal markers, thereby promoting a mesenchymal phenotype and invasion of ovarian cancer cells. This is also consistent with the increased expression of CXCR7 and the strong correlation with CXCL11 preferably taking place in the mesenchymal subtype of ovarian tumors, providing an activation pathway for EM transition. Recent studies in breast cancer cells have revealed that CXCR7 activation by SDF-1 increases components regulating cell adhesion and cell-matrix interaction, such as vascular adhesion molecule VCAM-1 and matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (Wani *et al.*, 2014), and SDF-1 also promoted MMP-9 expression in ovarian cancer cells (Yu *et al.*, 2014). Whether CXCR7 activation with I-TAC results in a similar effect is not known but the requisite implication of CXCR7 in promoting EMT transition and cell motility is strongly supportive.

The significant increase of CXCR7 gene expression in the mesenchymal subtype of the ovarian TCGA dataset is highly indicative of a role of CXCR7 in the acquisition of mesenchymal features. Consistent with this, we found a positive correlation of CXCR7 expression with a gene stromal signature built from overlapping genes from the TCGA mesenchymal subtype and the Tothill C1 (tumor desmoplasia) subtype samples that were positively correlated with mesenchymal markers and ECM remodeling (Verhaak *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Our GSEA of microdissected profiles revealed an enriched expression of CXCR7 in the stromal compartment of ovarian tumors in several datasets. Supporting this, CXCR7 levels positively correlated with classic ECM and reactive stromal cell markers, including FBN1 which is strongly associated with OC tumor staging and poor overall survival (Sun *et al.*, 2017). CXCL11 levels were also correlated with the stroma signature in the mesenchymal and differentiated subtypes, supporting a more context-dependent role of CXCL11. In line with

such role, CXCL11 has recently been identified as a predictive marker for OC clinical outcome (Jin *et al.*, 2018). In addition, when analyzed in the mesenchymal subtype, both CXCR7 and CXCL11 strongly correlate with genes associated with ECM and OC invasion phenotype. For instance, PRRX1 is considered a master regulator of a network hub driving OC metastasis (Khirade *et al.*, 2015). Therefore, the stromal signature of the CXCR7/CXCL11 pathway might contribute to enhance reactive stroma profile and stromal stiffness of tumors, both being highly predictive of primary chemoresistance and poor outcome (Ryner *et al.*, 2015). Such stromal expression pattern of CXCR7 and CXCL11 genes and their enrichment to mesenchymal OC subtype associated to worst prognosis support their contribution in the ability of the microenvironment to modulate cancer development, resulting in tumor dissemination.

Conclusions

Our study identifies the CXCR7/CXCL11 axis as a critical component of OC tumor stroma activation with a role of estrogen in promoting such transition, thereby determining the acquisition of metastatic phenotype and the fate of OC patients. Therefore, as depicted in Fig. 6F, our findings suggest that in the context of estrogen, increased expression of CXCR7 and of CXCL11 under ER α control might promote a feed-forward mechanism to induce ECM remodelling, EMT pathway and metastatic behaviour of ovarian cancer cells, by maintaining supported activation of the CXCR7/CXCL11 chemokine axis. Therefore, this forward mechanism might participate in the complex gene profile heterogeneity of ovarian cancer that dictates changes in tumor microenvironment and metastatic acquisition.

Author contributions

SM, EC and AT designed research; SM and LE performed experiments; SM, LE, KS, and EC contributed and prepared samples, reagents and analytic tools; SM and AT analysed data; SM, EC and AT wrote the manuscript.

Acknowledgments

We wish to thank Véronique Caron for expert technical assistance and members of the A.T. laboratory for critical reading and useful comments. We thank N. Heveker for the CXCR7 plasmid. S. B. has been supported by doctoral awards from the Fondation du CHU Ste Justine (FCHUSJ), and the Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) de l'Université de Montréal. L. E. has been supported by the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS) and the Réseau Québécois en Reproduction (RQR). K.S. has received a Banting & Best doctoral award from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (to A.T.).

References

- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M and Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**, 35760-35766.
- Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, Dhir R and P. DiSaia HG, P. Glenn, A. K. Godwin, J. Gross, L. Hartmann, M. Huang, D. G. Huntsman, M. Iacocca, M. Imielinski, S. Kalloger, B. Y. Karlan, D. A. Levine, G. B. Mills, C. Morrison, D. Mutch, N. Olvera, S. Orsulic, K. Park, N. Petrelli, B. Rabeno, J. S. Rader, B. I. Sikic, K. Smith-McCune, A. K. Sood, D. Bowtell, R. Penny & J. R. Testa (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615.
- Beral V, Million Women Study C, Bull D, Green J and Reeves G (2007) Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **369**, 1703-1710.
- Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, Jacquard C, Pillon A, Balaguer P, Balabanian K and Lazennec G (2012) Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLoS One* **7**, e44787.
- Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M and Pakdel F (2011) Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One* **6**, e20898.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC and Schall TJ (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* **203**, 2201-2213.
- Cancer Genome Atlas Research N (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615.
- Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN and Ngan HY (2008) Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol* **111**, 144-151.
- Chen M, Cui YK, Huang WH, Man K and Zhang GJ (2013) Phosphorylation of estrogen receptor alpha at serine 118 is correlated with breast cancer resistance to tamoxifen. *Oncology letters* **6**, 118-124.
- Ciucci A, Zannoni GF, Travaglia D, Petrillo M, Scambia G and Gallo D (2014) Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ERbeta) isoforms ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **132**, 351-359.
- Edjekouane L, Benhadjeba S, Jangal M, Fleury H, Gevry N, Carmona E and Tremblay A (2016) Proximal and distal regulation of the HYAL1 gene cluster by the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Oncotarget* **7**, 77276-77290.

- Figueras A, Alsina-Sanchis E, Lahiguera A, Abreu M, Muinelo-Romay L, Moreno-Bueno G, Casanovas O, Graupera M, Matias-Guiu X, Vidal A, Villanueva A and Vinals F (2018) A Role for CXCR4 in Peritoneal and Hematogenous Ovarian Cancer Dissemination. *Mol Cancer Ther* **17**, 532-543.
- Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, Ishiwata I, Nagai Y, Shozu M and Kimura S (2007) Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Hum Pathol* **38**, 1676-1687.
- Gallo D, Ferlini C and Scambia G (2010) The epithelial-mesenchymal transition and the estrogen-signaling in ovarian cancer. *Curr Drug Targets* **11**, 474-481.
- Guo Q, Gao BL, Zhang XJ, Liu GC, Xu F, Fan QY, Zhang SJ, Yang B and Wu XH (2014) CXCL12-CXCR4 Axis Promotes Proliferation, Migration, Invasion, and Metastasis of Ovarian Cancer. *Oncol Res* **22**, 247-258.
- Hall JM and Korach KS (2003) Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **17**, 792-803.
- Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, Leupold JH, Wenz F, Zeller WJ, Fruehauf S and Allgayer H (2014) The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 604-616.
- Hildebrand JS, Gapstur SM, Feigelson HS, Teras LR, Thun MJ and Patel AV (2010) Postmenopausal hormone use and incident ovarian cancer: Associations differ by regimen. *Int J Cancer* **127**, 2928-2935.
- Hudson LG, Zeineldin R and Stack MS (2008) Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* **25**, 643-655.
- Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, Wada H, Date H and Miyahara R (2009) Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **115**, 2580-2593.
- Jaszczynska-Nowinka K, Rucinski M, Ziolkowska A, Markowska A and Malendowicz LK (2014) Expression of SDF-1 and CXCR4 transcript variants and CXCR7 in epithelial ovarian cancer. *Oncology letters* **7**, 1618-1624.
- Jeon SY, Hwang KA and Choi KC (2016) Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **158**, 1-8.
- Jin C, Xue Y, Li Y, Bu H, Yu H, Zhang T, Zhang Z, Yan S, Lu N and Kong B (2018) A 2-Protein Signature Predicting Clinical Outcome in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* **28**, 51-58.

- Khirade MF, Lal G and Bapat SA (2015) Derivation of a fifteen gene prognostic panel for six cancers. *Sci Rep* **5**, 13248.
- Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, Michalides R, Stal O, Linn S and Landberg G (2009) Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**, 1725-1729.
- Kommos S, Gilks CB, du Bois A and Kommos F (2016) Ovarian carcinoma diagnosis: the clinical impact of 15 years of change. *Br J Cancer*.
- Konecny GE, Wang C, Hamidi H, Winterhoff B, Kalli KR, Dering J, Ginther C, Chen HW, Dowdy S, Cliby W, Gostout B, Podratz KC, Keeney G, Wang HJ, Hartmann LC, Slamon DJ and Goode EL (2014) Prognostic and therapeutic relevance of molecular subtypes in high-grade serous ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **106**.
- Kyriakidis I and Papaioannidou P (2016) Estrogen receptor beta and ovarian cancer: a key to pathogenesis and response to therapy. *Arch Gynecol Obstet* **293**, 1161-1168.
- La Vecchia C (2017) Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev* **26**, 55-62.
- Lau KM, Mok SC and Ho SM (1999) Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5722-5727.
- Letourneau IJ, Quinn MC, Wang LL, Portelance L, Caceres KY, Cyr L, Delvoye N, Meunier L, de Ladurantaye M, Shen Z, Arcand SL, Tonin PN, Provencher DM and Mes-Masson AM (2012) Derivation and characterization of matched cell lines from primary and recurrent serous ovarian cancer. *BMC Cancer* **12**, 379.
- Lieberman J, Sartelet H, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, Vassal G, Joseph JM and Gross N (2012) Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS One* **7**, e43665.
- Liu CF, Liu SY, Min XY, Ji YY, Wang N, Liu D, Ma N, Li ZF and Li K (2014) The prognostic value of CXCR4 in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One* **9**, e92629.
- Malvezzi M, Carioli G, Rodriguez T, Negri E and La Vecchia C (2016) Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Ann Oncol* **27**, 2017-2025.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC and Schall TJ (2007) CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 15735-15740.

Park SH, Cheung LW, Wong AS and Leung PC (2008) Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* **22**, 2085-2098.

Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M and Tremblay A (2012) Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* **32**, 2709-2721.

Popple A, Durrant LG, Spendlove I, Rolland P, Scott IV, Deen S and Ramage JM (2012) The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br J Cancer* **106**, 1306-1313.

Rodrigue-Way A, Caron V, Bilodeau S, Keil S, Hassan M, Levy E, Mitchell GA and Tremblay A (2014) Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPARgamma/PGC-1alpha pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J* **28**, 1910-1923.

Ryner L, Guan Y, Firestein R, Xiao Y, Choi Y, Rabe C, Lu S, Fuentes E, Huw LY, Lackner MR, Fu L, Amler LC, Bais C and Wang Y (2015) Upregulation of Periostin and Reactive Stroma Is Associated with Primary Chemoresistance and Predicts Clinical Outcomes in Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* **21**, 2941-2951.

Saha A, Ahn S, Blando J, Su F, Kolonin MG and DiGiovanni J (2017) Proinflammatory CXCL12-CXCR4/CXCR7 Signaling Axis Drives Myc-Induced Prostate Cancer in Obese Mice. *Cancer Res* **77**, 5158-5168.

Sanchez M, Picard N, Sauve K and Tremblay A (2010) Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab* **21**, 104-110.

Sanchez M, Picard N, Sauve K and Tremblay A (2013) Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene* **32**, 117-126.

Sanchez-Martin L, Sanchez-Mateos P and Cabanas C (2013) CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med* **19**, 12-22.

Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N and Tremblay A (2009) Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Cancer Res* **69**, 5793-5800.

Sieh W, Kobel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, Hogdall E, Deen S, Wentzensen N, Moysich KB, Brenton JD, Clarke BA, Menon U, Gilks CB, Kim A, Madore J, Fereday S, George J, Galletta L, Lurie G, Wilkens LR, Carney ME, Thompson PJ, Matsuno RK, Kjaer SK, Jensen A, Hogdall C, Kalli KR, Fridley BL, Keeney GL, Vierkant RA, Cunningham JM, Brinton LA, Yang HP, Sherman ME, Garcia-Closas M, Lissowska J, Odunsi K, Morrison C, Lele S, Bshara W, Sucheston L, Jimenez-Linan M, Driver K, Alsop J, Mack M, McGuire V, Rothstein JH, Rosen BP, Bernardini MQ, Mackay H, Oza A, Wozniak EL, Benjamin E, Gentry-Maharaj A, Gayther SA, Tinker AV, Prentice LM, Chow C, Anglesio MS, Johnatty SE,

Chenevix-Trench G, Whittemore AS, Pharoah PD, Goode EL, Huntsman DG and Ramus SJ (2013) Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol* **14**, 853-862.

Singh RK and Lokeshwar BL (2011) The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res* **71**, 3268-3277.

Sun Q, Zhao H, Zhang C, Hu T, Wu J, Lin X, Luo D, Wang C, Meng L, Xi L, Li K, Hu J, Ma D and Zhu T (2017) Gene co-expression network reveals shared modules predictive of stage and grade in serous ovarian cancers. *Oncotarget* **8**, 42983-42996.

Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A and Ohmichi M (2014) The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res* **7**, 76.

Thelen M and Thelen S (2008) CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* **198**, 9-13.

Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ, Fereday S, Lawrence M, Carter SL, Mermel CH, Kostic AD, Etemadmoghadam D, Saksena G, Cibulskis K, Duraisamy S, Levanon K, Sougnez C, Tsherniak A, Gomez S, Onofrio R, Gabriel S, Chin L, Zhang N, Spellman PT, Zhang Y, Akbani R, Hoadley KA, Kahn A, Kobel M, Huntsman D, Soslow RA, Defazio A, Birrer MJ, Gray JW, Weinstein JN, Bowtell DD, Drapkin R, Mesirov JP, Getz G, Levine DA, Meyerson M and Cancer Genome Atlas Research N (2013) Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **123**, 517-525.

Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R and Taichman RS (2008) The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* **283**, 4283-4294.

Wani N, Nasser MW, Ahirwar DK, Zhao H, Miao Z, Shilo K and Ganju RK (2014) C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* **16**, R54.

Weigel NL and Moore NL (2007) Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nucl Recept Signal* **5**, e005.

Wu W, Qian L, Chen X and Ding B (2015) Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 13217-13224.

Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Kobayashi S, Fujii Y and Iwase H (2008) Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERalpha) serine 118 and high phosphorylation of ERalpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **15**, 755-763.

Yang Z, Yang X, Xu S, Jin P, Li X, Wei X, Liu D, Huang K, Long S, Wang Y, Sun C, Chen G, Hu J, Meng L, Ma D and Gao Q (2017) Reprogramming of stromal fibroblasts by SNAI2 contributes to tumor desmoplasia and ovarian cancer progression. *Mol Cancer* **16**, 163.

Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, Tremblay A, Provencher DM, Mes-Masson AM and Carmona E (2011) Subtype specific elevated expression of hyaluronidase-1 (HYAL-1) in epithelial ovarian cancer. *PLoS One* **6**, e20705.

Yu Y, Li H, Xue B, Jiang X, Huang K, Ge J, Zhang H and Chen B (2014) SDF-1/CXCR7 axis enhances ovarian cancer cell invasion by MMP-9 expression through p38 MAPK pathway. *DNA Cell Biol* **33**, 543-549.

Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F and Ren GS (2010) Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 31.

Zhou B, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Yang L and Wang B (2008) Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* **108**, 641-651.

Supporting information

Fig. S1. ER α and CXCR7 expression in reproductive cancer cells and tumors

Fig. S2. ER β and CXCR3 expression in ovarian cancer cells and tumors

Fig. S3. Correlation analysis of CXCR7 and CXCL11 in ovarian cancer subtypes

Fig. S4. Enrichment of ER α at the ERE of the PGR gene

Fig. S5. Maximal activation of ER α by the CXCR7/SDF-1 chemokine axis requires Ser-118

Fig. S6. CXCR7 and CXCL11 expression is associated with OC stromal signature and markers

Fig. S7. CXCR7 and CXCL11 expression correlates with ECM markers

Fig. S8. CXCR7 expression is associated with EMT indicators

Figure Legends

Fig 1 CXCR7 is strongly expressed in ER α -positive gynecologic cancer cells and tumor stroma.

(A) A panel of uterine, ovary, and breast cancer cell lines was analyzed for CXCR7 mRNA expression by qPCR. Each expression value was quantified to RPLP0 expression. Data are representative of at least 3 independent experiments performed in triplicates. Error bars represent SEM. (B) Boxplots showing the expression levels of CXCR7/ACKR3 in microdissected normal and tumor epithelium with respective matched surrounding stromal sections included in the ovarian dataset GSE40595. (C) Boxplots of the expression level of CXCR7 in microdissected normal and tumor samples of GSE38666. (D) Boxplots showing the relative CXCR7 expression in the various molecular subtypes of the ovarian TCGA dataset. (E) Boxplots of the expression level of ESR1 in microdissected normal and tumor samples of GSE38666. (F) Estrogen-regulation of CXCR7 gene expression. Cells were treated with 10 nM 17 β -estradiol (E2) or ethanol vehicle (-) for 16 hrs, and then harvested for CXCR7 expression as in A. Data were analyzed using Student's t-test and are representative of at least 3 independent experiments performed in triplicates. Error bars represent SEM. *, P < 0.001 versus respective vehicle-treated cells.

Fig 2 Regulation of CXCR7 expression by ER α and expression correlation of the

CXCR7/CXCL11 axis in human ovarian tumors. (A) Estrogen upregulates CXCR7 gene expression through ER α in ovarian cancer cells. OVCAR-3 cells were treated with 10 nM each of E2 or selective agonist for ER α (PPT) or ER β (DPN) for 16 hrs. ER antagonist ICI 182,780 was also used at 100 nM. Cells were then analyzed for CXCR7 expression by qPCR. Values represent

fold response (mean \pm SEM) compared to vehicle-treated cells, and are derived from at least 3 independent experiments performed in triplicates. Data were analyzed using Student's t-test. *, $P < 0.03$; **, $P < 0.001$ versus vehicle-treated cells. (B) ER-negative parental TOV21G cells were stably transfected with human ER α or ER β coding vector and compared to control (mock) cells. Cells were then treated with 10 nM E2 and harvested for CXCR7 expression as in A. Data are expressed as mean \pm SEM and statistical analysis was performed as in A. *, $P < 0.03$; **, $P < 0.001$ versus respective vehicle-treated cells. (C) Regulation of chemokine genes by estrogen in ovarian cancer cells. OVCAR-3 cells were treated with 10 nM E2 for 16 hrs and gene expression determined by qPCR. Data are expressed as fold response (mean \pm SEM) compared to vehicle-treated cells and statistical analysis was performed as in A. *, $P < 0.03$ versus respective vehicle-treated cells. (D) Human TOV2295 and TOV3133G cells were treated with 10 nM E2 for 16 hrs and gene expression determined by qPCR. Data are expressed as fold response (mean \pm SEM) compared to vehicle-treated cells set at 1.0 for each gene. Statistical analysis was performed as in A. *, $P < 0.03$; **, $P < 0.001$ versus respective vehicle-treated cells. (E) Boxplots of the expression level of CXCR7 in microdissected normal and tumor samples of GSE38666. (F) Scatter plot and Pearson correlation showing the expression level of CXCR7 and that of CXCL11 in the mesenchymal subtype of the ovarian TCGA dataset. Pearson correlation score and P value are indicated.

Fig 3 Schematic of predicted and ChIP-validated ER α -binding sites within the human CXCR7 locus. (A) UCSC genome view of ER α enrichment at the CXCR7 locus as determined by ChIP-seq analysis. Peaks were mapped from Ishikawa and MCF-7 cells treated with vehicle and 10 nM estradiol (E2), and aligned on the reference genome hg38. (B) ChIP-qPCR assessment of ER α

binding sites identified from ChIP-seq analysis at the CXCR7 gene. OVCAR-3 cells were treated with 10 nM E2 for 45 min and compared to vehicle treatment. ChIP-qPCR mapping of active histone H3K27ac and repressive H3K27me3 marks, and of ER β , relative to each ERE was also performed. ChIPed proteins are indicated on top of each graph. Values (mean \pm SEM) were derived from at least three independent ChIP experiments performed in duplicates, and analyzed using Student's t-test. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001 versus vehicle-treated cells. (C) Activation of human CXCR7 proximal P2 promoter by E2. Luciferase reporter gene constructs were prepared using DNA fragments corresponding to proximal P1 (upstream from the transcriptional start site) and P2 (in intron 1) promoter regions of CXCR7 gene containing the indicated EREs as schematized. Luciferase assay was performed in 293 cells transfected with ER α (*left*) and in OVCAR-3 cells (*right*) treated or not with 10 nM E2 for 16hrs. Truncated P2 Δ 1 and P2 Δ 2 fragments, and ERE-42463 mutated P2 (mP2) were also analyzed. Luciferase activities were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response (mean \pm SEM) compared to untreated cells set at 1.0 for each construct. Data were analyzed using Student's t-test. **, P < 0.01 versus vehicle-treated cells.

Fig 4 CXCR7 is required for maximal induction of ER α activity. (A) Cross-regulation of CXCR7 P2 promoter activity with ER α . shCXCR7-infected OVCAR-3 cells were transfected with P2-Luc reporter and subjected to luciferase assay compared to control shCtl cells. Cells were treated or not with 10 nM E2, 25 nM ITAC or 25 nM SDF-1 for 16 hrs. Results were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared to untreated shCtl cells set at 1.0. Values (mean \pm SEM) were derived from at least three independent experiments performed in

triplicates, and analyzed using Student's t-test. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$. (B) CXCR7 is required for maximal induction of estrogen-responsive genes. qPCR analysis of PGR and CXCL11 expression in shCtl and shCXCR7-expressing stable OVCAR-3 cells treated or not with 10 nM E2 for 16hrs. Each expression value was quantified to RPLP0 and expressed as fold response compared to untreated respective cells. Results were derived from at least three independent ChIP experiments performed in triplicates. Bars represent SEM.

Fig 5 CXCR7 signaling triggers ER α Ser-118 phosphorylation and chromatin recruitment. (A) CXCR7 activation enhances ER α phosphorylation at Ser-118. 293 cells were transfected with ER α and CXCR7 as indicated, and then treated or not with 25 and 50 nM I-TAC for 30min. Western analysis was performed using pan and pSer-118 specific ER α antibodies. Erk1/2 phosphorylation was also monitored in samples, and β -actin for control loading. (B) Estrogen-induced Ser-118 phosphorylation is dependent on CXCR7. Stable shCtl and shCXCR7-expressing OVCAR-3 cells were treated or not with 10 nM E2 and then subjected to Western analysis as in A. (C) 293 cells were transfected with wild-type or S118A mutated ER α in presence of P2-Luc reporter, and then treated or not with 10 nM E2 and 25 nM I-TAC for 16 hrs. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared to respective untreated cells set at 1.0. Values (mean \pm SEM) were derived from at least three independent ChIP experiments performed in triplicates, and analyzed using Student's t-test. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$. (D) I-TAC promotes recruitment of Ser-118 phosphorylated ER α to the CXCR7 gene. OVCAR-3 cells were treated with 50 nM I-TAC for 45 min and subjected to ChIP-qPCR analysis of ER α binding sites identified from ChIP-seq analysis. An

antibody against ER α pSer-118 was used for ChIP. Values (mean \pm SEM) were derived from at least three independent ChIP experiments performed in duplicates, and analyzed using Student's t-test. **, P < 0.001 versus respective vehicle-treated cells.

Fig 6 The ER α -CXCR7 cross-regulation induces the EMT pathway and migration of ovarian cancer cells. (A) Scatter plots of CXCR7 expression compared to the stromal signature score for each subtype in the ovarian TCGA dataset. Pearson correlation rate and P value are indicated. (B) Representative images of linear wounds made on shCXCR7 stably expressing OVCAR-3 cells compared to shCtl control cells. Cells were treated or not (vehicle) with 10 nM E2 over a period of 48hrs. (C) Quantitative determination of wound closure calculated as % wound area healed relative to 0h time period. Results were recorded from three independent experiments performed in duplicate. Data were analyzed using Student's t-test. Bars represent SEM. *, P < 0.05 versus control vehicle-treated cells. (D) Estrogen induction of the EMT pathway is dependent on CXCR7. shCXCR7 expressing OVCAR-3 cells and control shCtl cells were treated with 10 nM E2 or vehicle for 16hrs. Western analysis was performed on EMT markers and β -actin used for control loading. (E) qPCR analysis was performed on shCXCR7 expressing OVCAR-3 cells treated as in (D) and compared to control shCtl cells. Expression levels of EMT genes were normalized to RPLP0 and expressed as fold response compared to untreated cells. Results were derived from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed using Student's t-test. Bars represent SEM. *, P < 0.05 versus control vehicle-treated cells. (F) Proposed model of ER α -CXCR7 interplay in ovarian cancer cells. Estrogenic activation of ER α results in increased expression of CXCR7, identified as a direct target gene, and of CXCL11/I-

TAC gene, which in turn triggers the Erk pathway that promotes Ser-118 phosphorylation and feedback ER α activation. Although not regulated by estrogen, SDF-1 also a CXCR7 ligand can as well promote CXCR7 signaling to activate ER α . Such interplay determines an ER α -CXCR7 feed-forward mechanism that results in activation of the EMT pathway and enhanced migration potential of ovarian cancer cells.

Fig. 1

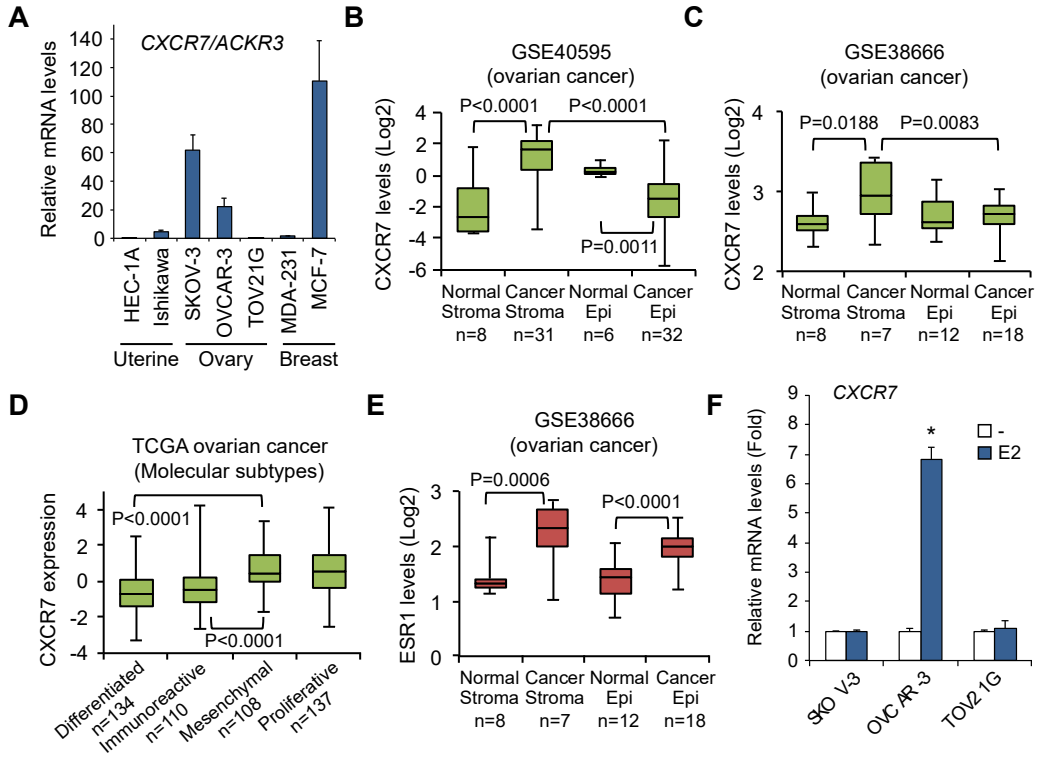


Fig. 2

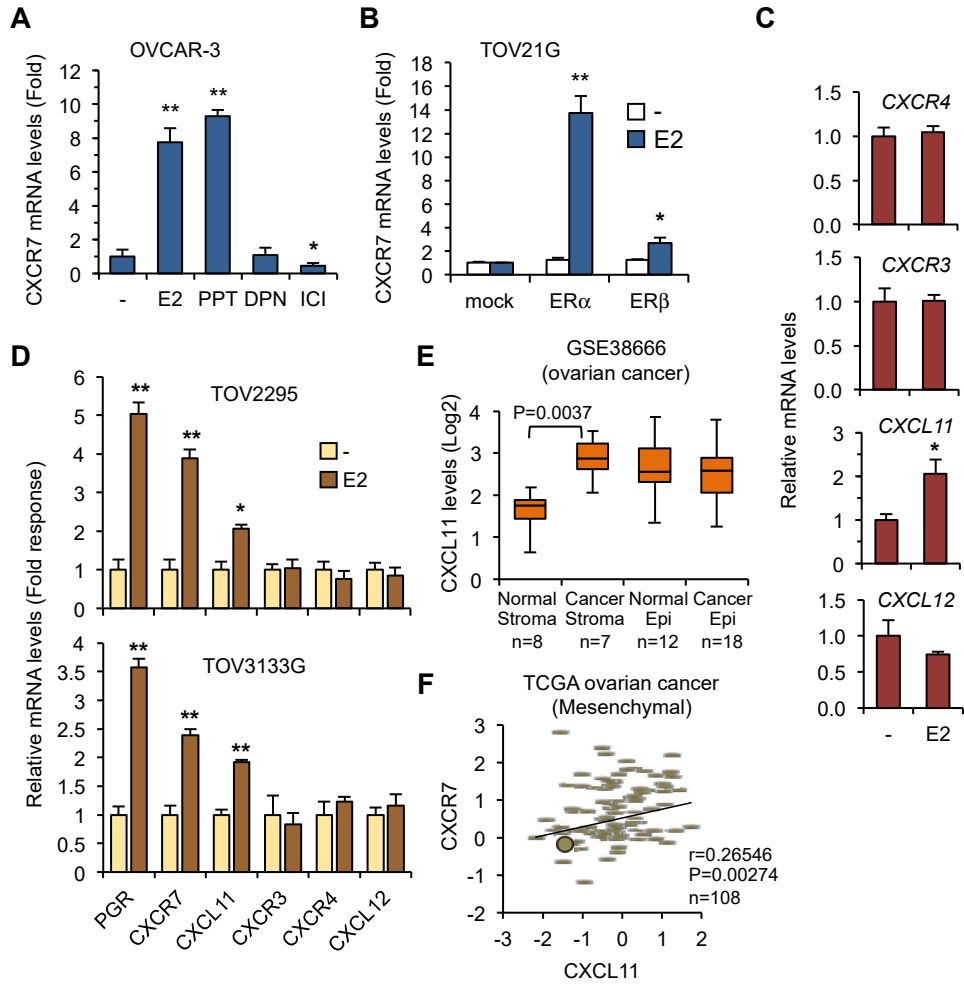


Fig. 3

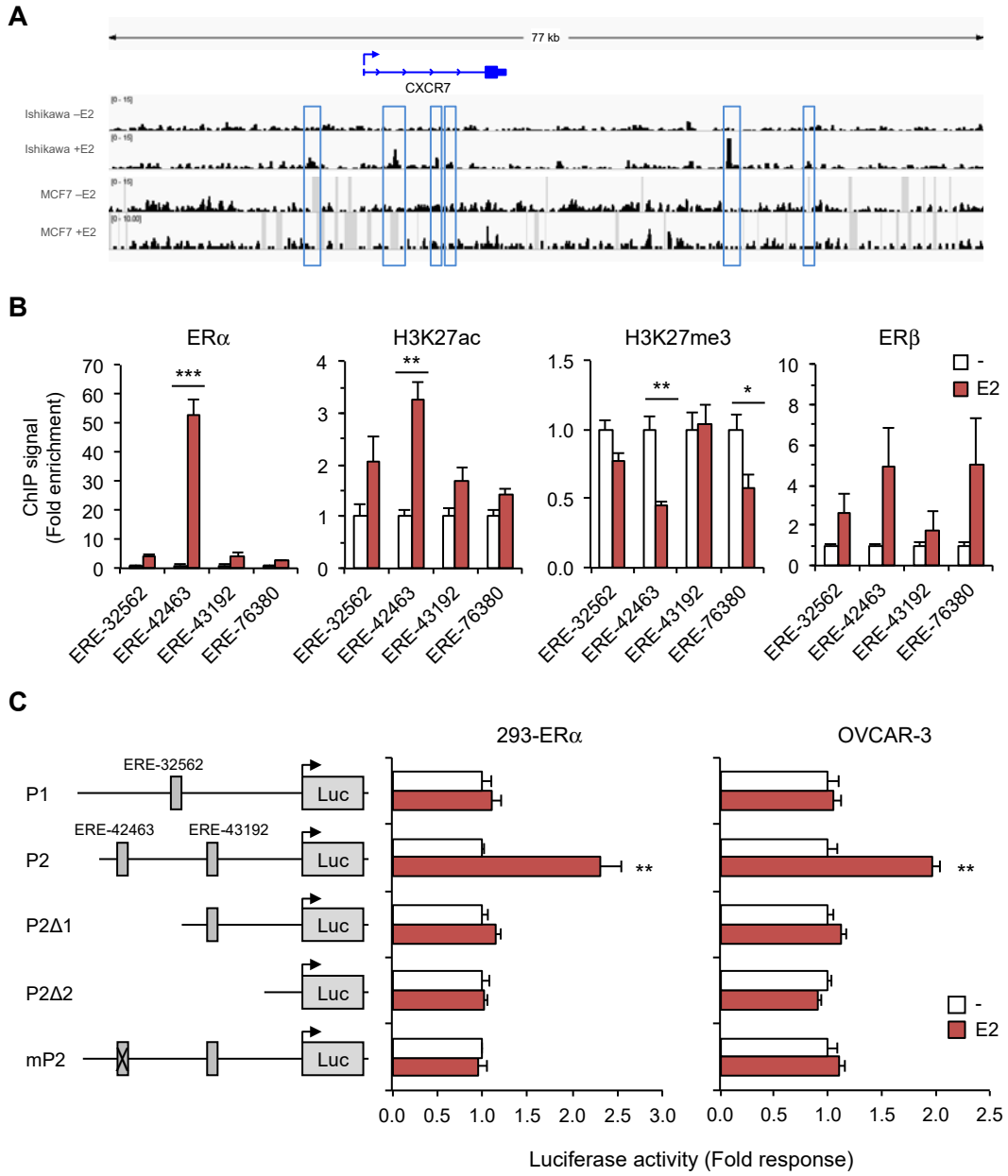


Fig. 4

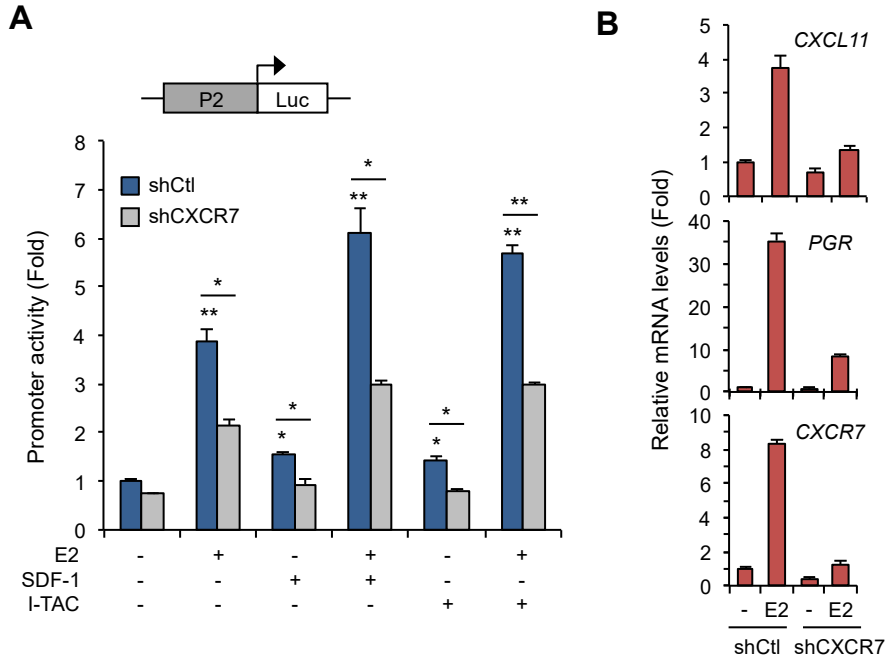


Fig. 5

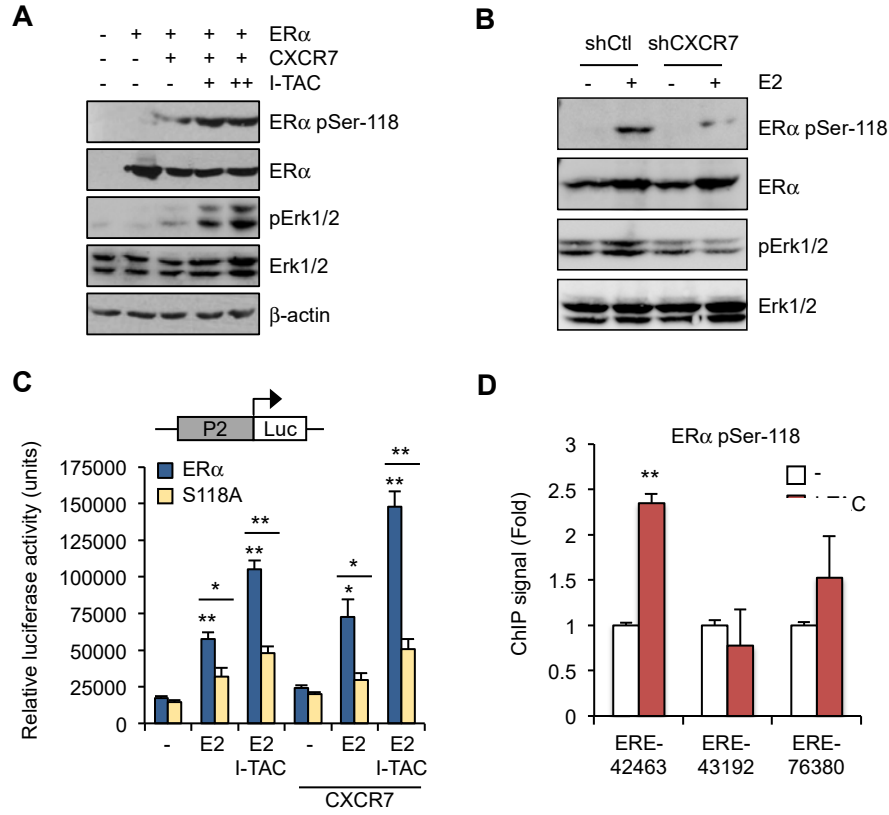


Fig. 6

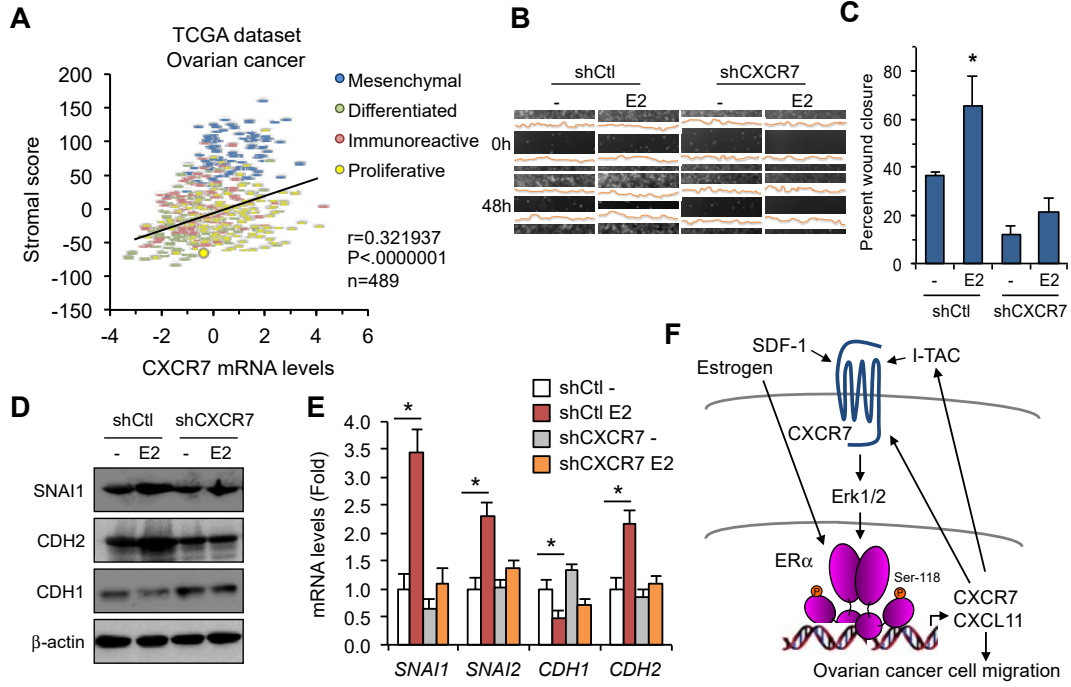


Fig. S1

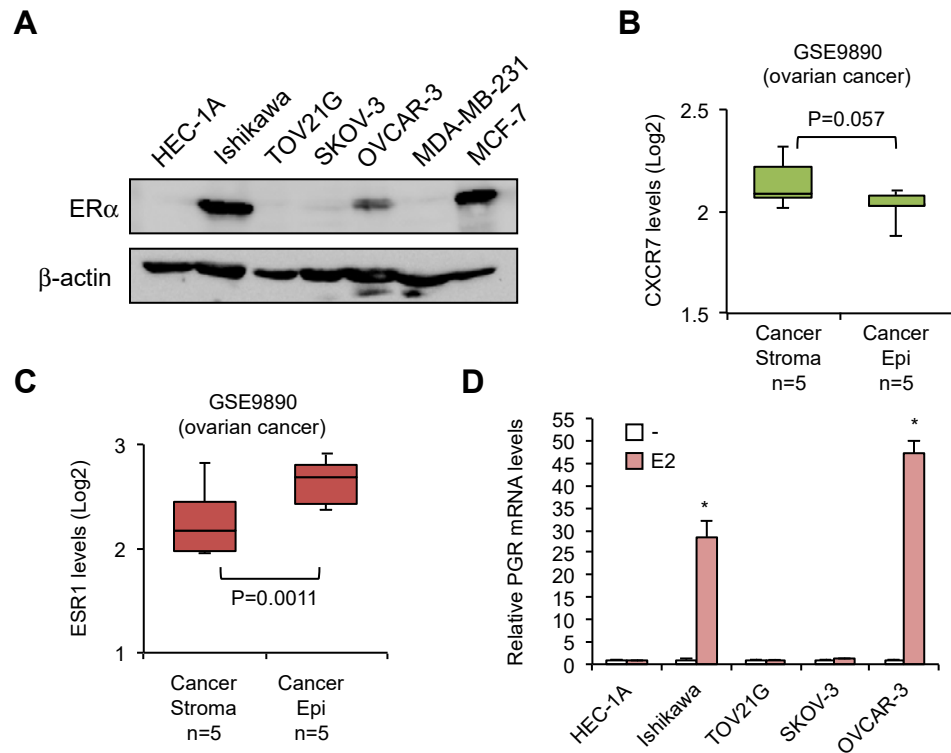


Fig. S1. ER α and CXCR7 expression in reproductive cancer cells and tumors

A- ER α protein levels in endometrial, ovarian and breast cancer cells determined by Western analysis. **B-** Boxplots of the expression levels of CXCR7 in the microdissected tumor stroma and epithelium of GSE9890 dataset. **C-** Boxplots of the expression levels of ESR1 in the GSE9890 dataset. **D-** qPCR analysis of progesterone receptor (PGR) gene expression in cells treated with 10nM estradiol (E2) for 16hrs. Results were normalized to RPLP0 expression. Values represent mean \pm SEM derived from three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed using Student's t-test. *, P < 0.001 versus control vehicle-treated cells.

Fig. S2

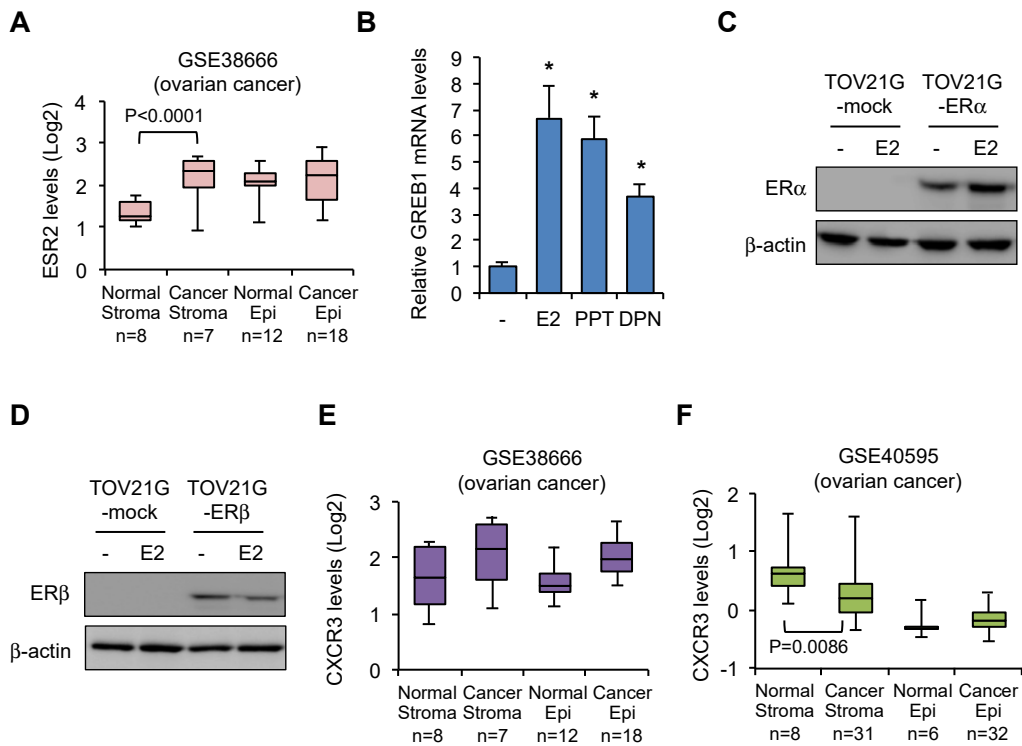


Fig. S2. ERβ and CXCR3 expression in ovarian cancer cells and tumors

A- Boxplots of the expression levels of ESR2 (ERβ) in microdissected normal epithelium, normal stroma, tumor epithelium and tumor stroma included in the ovarian dataset GSE38666. **B-** OVCAR-3 cells were treated with 10 nM each of E2 or selective agonist for ERα (PPT) or ERβ (DPN) for 16 hrs. Cells were then analyzed for GREB1 expression by qPCR. Values represent fold response compared to vehicle-treated cells. Results were derived from three independent experiments performed in triplicate. Errors represent SEM. Data were analyzed using Student's t-test. *, P < 0.005 versus control vehicle-treated cells. **C-** ER-negative ovarian cancer TOV21G cells were stably transfected with human ERα. Validation of expression was performed by Western analysis of cells treated or not with 10nM E2 and compared to mock-transfected parental cells. **D-** Similar as in (C) except that TOV21G cells were stably transfected with ERβ. **E-** Boxplots of the expression levels of CXCR3 in the GSE38666 dataset. **F-** Boxplots of the expression levels of CXCR3 in the GSE40595 dataset.

Fig. S3

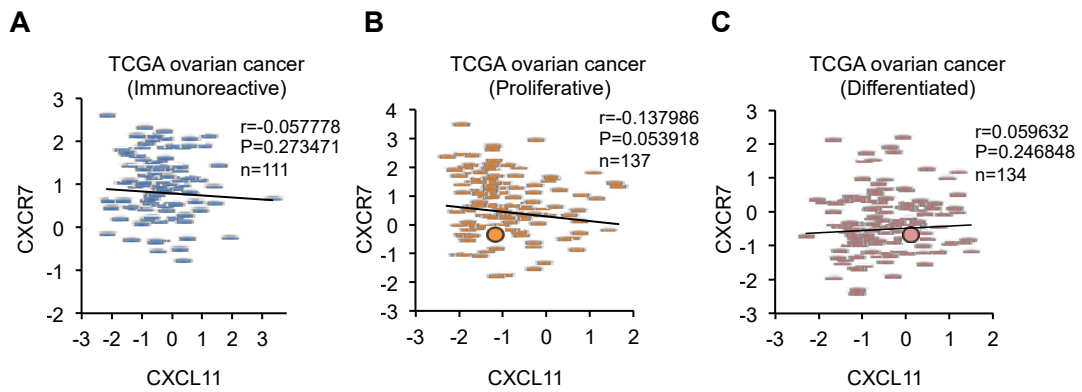


Fig. S3. Correlation analysis of CXCR7 and CXCL11 in ovarian cancer subtypes.

A-C Scatter plots of CXCR7 and CXCL11 expression levels in the immunoreactive (**A**), proliferative (**B**), and differentiated (**C**) molecular subtypes stratified from the ovarian TCGA dataset. Pearson correlation scores (r) and P values are indicated for each.

Fig. S4

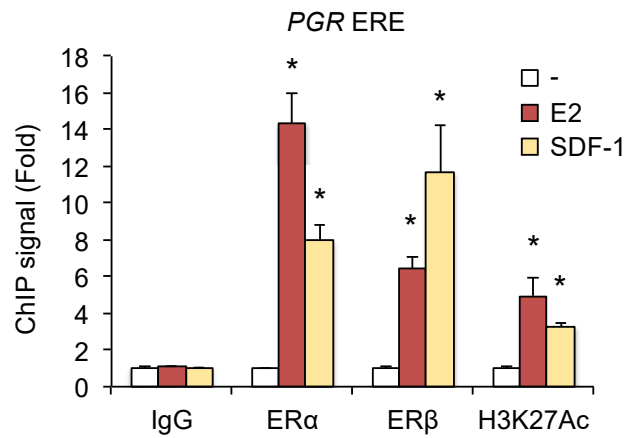


Fig. S4. Enrichment of ER α at the ERE of the PGR gene

OVCAR-3 cells were treated or not with 10nM E2 or 25nM SDF-1 for 45 min and harvested for ChIP-qPCR analysis using antibodies for ER α , ER β , or active histone H3K27ac mark. Preimmune IgGs were used as a negative control. Values represent mean \pm SEM derived from three independent ChIP experiments performed in duplicate. Data were analyzed using Student's t-test. *, P < 0.01 versus control vehicle-treated cells.

Fig. S5

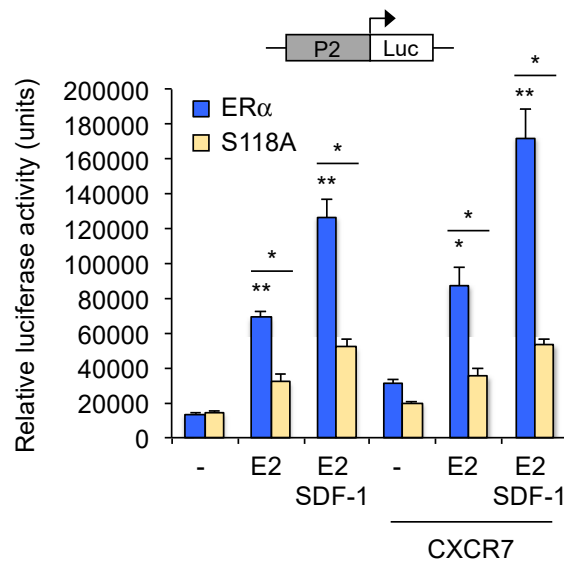


Fig. S5. Maximal activation of ER α by the CXCR7/SDF-1 chemokine axis requires Ser-118

293 cells were transfected with wild-type ER α or S118A mutant in the presence of a luciferase reporter gene under the control of CXCR7 P2 promoter (P2-Luc). Cells were also transfected with CXCR7 as indicated. Cells were then treated or not with 10nM E2 and 50nM SDF-1 for 16h. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as relative response compared to vehicle-treated cells. Values represent mean \pm SEM derived from at least three independent experiments performed in triplicate. Data were analyzed using Student's t-test. Significance was determined compared to respective untreated control cells, and between ER α and S118A-transfected cells. *, P < 0.01; **, P < 0.001

Fig. S6

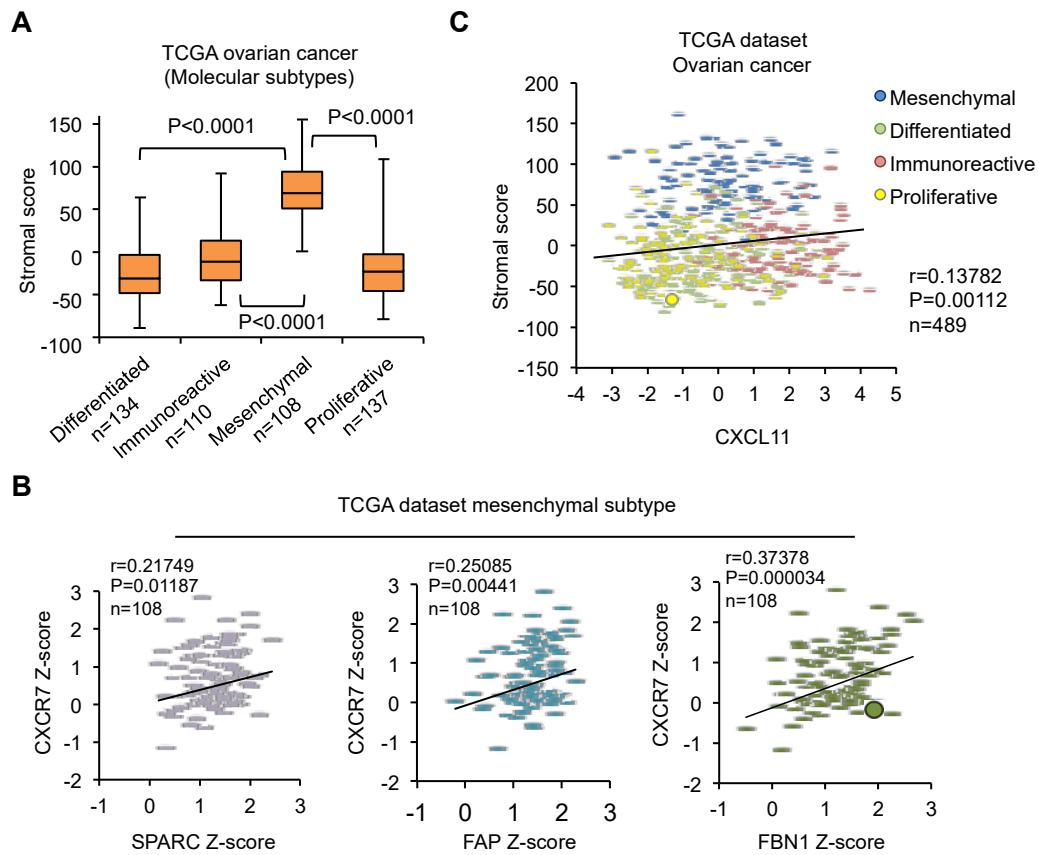


Fig. S6. CXCR7 and CXCL11 expression is associated with OC stromal signature and markers.

A- Boxplots from GSEA analysis of stromal signature score in the various molecular subtypes of the ovarian TCGA dataset. **B-** Scatter plots of CXCR7 expression relative to stromal markers in the mesenchymal subtypes of the ovarian TCGA dataset. **C-** Pearson correlation analysis of CXCL11 expression with the stromal signature in all four molecular subtypes of the TCGA dataset. Pearson correlation scores (r) and P values are indicated for each.

Fig. S7

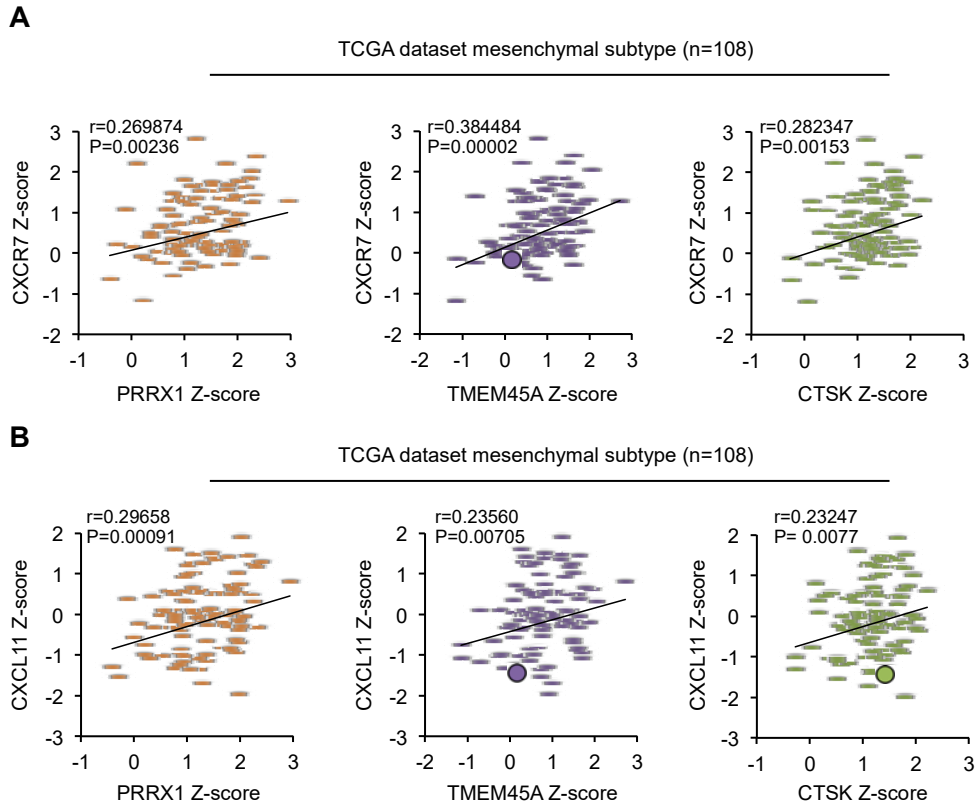


Fig. S7. CXCR7 and CXCL11 expression correlates with ECM markers.

A- Pearson correlation analysis of CXCR7 expression with markers of extracellular matrix (ECM) remodeling in the mesenchymal subtype of the ovarian TCGA dataset. **B-** Correlation analysis of CXCL11 expression performed as in (A). Pearson correlation scores (r) and P values are indicated for each.

Fig. S8

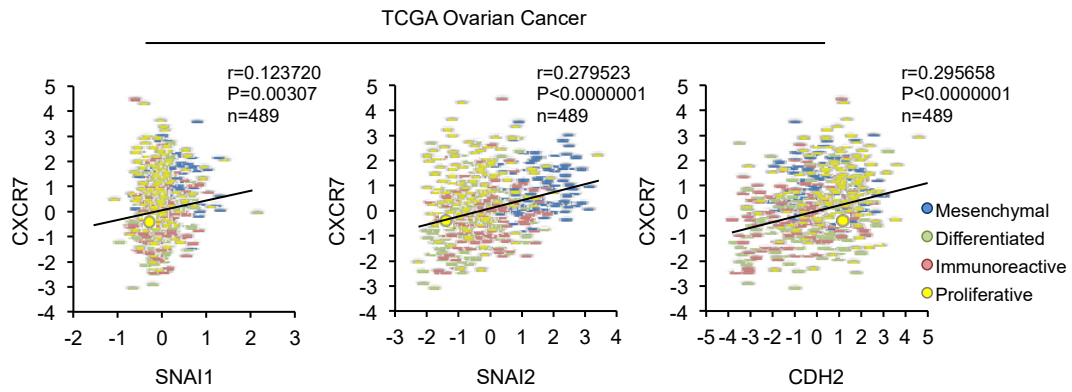


Fig. S8. CXCR7 expression is associated with EMT indicators.

A- Pearson correlation analysis of CXCR7 expression with markers of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in the ovarian TCGA dataset. Each molecular subtypes are color-coded. Pearson correlation scores (r) and P values are indicated for each.

2e publication

The propyl isomerase Pin1 enhances the migration potential of estrogen receptor β in breast cancer cells

Samira Benhadjeba^{1,2}, Lydia Edjekouane^{1,2}, and André Tremblay^{1,2,3}

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Departments of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

Short title: Pin1 regulation of ER β

Keywords: estrogen receptor beta; NR3A2; CXCL12; breast cancer

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca

Contributions des auteurs

Samira Benhadjeba: À titre de premier auteur, en me basant sur les résultats préalables obtenues par une étudiante au doctorat, Karine Sauvé, et les résultats obtenus lors de mon travail de maîtrise, j'ai mis au point les conditions expérimentales, j'ai réalisé et analysé toutes les expériences présentées. J'ai également écrit la première version de l'article.

Lydia Edjekouane: a participé activement aux discussions et a apporté son aide et expertise à de nombreuses reprises sur les expériences de co-immuno-précipitation et de migration cellulaire (Figures 1A, 5A-B).

Karine Sauvé: a réalisé certaines constructions utilisées dans cet article. Elle a également apporté son aide et expertise étant donné qu'elle avait commencé le projet avant mon arrivée au laboratoire.

Dr André Tremblay: En tant que superviseur, le Dr. Tremblay a supervisé et a participé à la conception du projet. Il a également révisé et corrigé l'article.

Abstract

Estrogen-regulated gene transcription plays an important role in normal reproductive physiology but is also linked to breast cancer development and growth. The cellular response to estrogen is mediated via estrogen receptors ER α and ER β , which also undergo post-translational modifications such as phosphorylation to achieve their transcriptional competence. Although ER α phosphorylation is well recognized and correlates with patient outcome, how ER β phosphorylation can affect breast cancer cell behavior remains elusive. Here, we show that the propyl isomerase Pin1 can interact with phosphorylated ER β , resulting in increased transcriptional activation to hormone and estrogen-responsive gene expression in breast cancer cells. These effects were dependent on both the WW domain and the isomerase activity of Pin1, providing a dual checkpoint for ER β regulation. We identified serine-87 located in the AF-1 region of ER β which, upon hormone-induced phosphorylation, was essential for Pin-1 recruitment, supporting a cis-trans isomerization of the pS87-P88 peptidic bond to enhance ER β transcriptional function. We demonstrate that Pin1 can increase ER β stability, providing a role for pSer-87 in ER β turnover. Pin1 also promoted the ER β potential to increase breast cancer cell migration in response to estrogen, suggesting a pro-migratory effect of pSer-87 in a context of ER α negative expression. Our study identifies Pin1 as a novel regulator of ER β function and implicates Pro-directed Ser-87 phosphorylation as a mechanism to coordinate proper conformational changes and migration potential to ER β in breast cancer cells.

Introduction

Estrogens are central to the differentiation and development of reproductive tissues and sexual characteristics, but are also considered oncogenic in gynecological cancers, such as uterus and breast cancer. Such estrogen-dependent effects are supported through the interaction with estrogen receptors ER α and ER β , members of the nuclear receptor family of ligand-activated transcription factors (465). More than two-thirds of breast tumors do express ER α , providing a first line therapy using selective ER modulators (SERM), such as tamoxifen. Unfortunately, resistance to SERMs often ensues with relapse of disease and poor prognosis (466). Preclinical and clinical studies have linked enhanced growth factor receptor signaling with failure of endocrine therapy (467, 468). MAPK/Erk activation is recurrent in ER-positive cancer cells and in tumors of patients maintained on tamoxifen (469-472) and site-specific Erk phosphorylation of ER α and ER β (40) was suggested to sustain ER activity. This emphasizes an important role of ER phosphorylation to maintain undesired estrogen-like effects.

While the prognostic value of ER α is strong in breast cancer, the role of ER β in breast tumorigenesis is still discussed (473, 474). For example, loss of ER β expression was associated with resistance to endocrine therapy (475), and in vitro re-expression of ER β enhanced the effects of chemotherapy agents (476, 477). Other studies revealed a positive correlation between ER β expression and cell proliferation (478, 479). Thus, further studies are required to provide more tools to understand the role of ER β in breast cancer.

ER α and ER β share two distinct activation function domains (AF), which allow for transcriptional activity. Activation of AF-2 is direct and well characterized as it requires the ligand and mediates recruitment of coactivators to facilitate chromatin remodeling and

transcription (106, 480). In contrast, activation of AF-1 remains less understood, and structural studies to unravel how AF-1 works are difficult to interpret due to its inherent disordered conformation (481). However, it is known that AF-1 activity is more variable and ER isoform-specific (only 15% homology), cannot be blocked by tamoxifen, and relies on coordinated phosphorylation, mostly involving Ser-Pro motifs for MAPK, which dictate ligand-independent ER α and ER β activity (40). In addition, AF-1 activation relies on cofactor recruitment (106, 170) and promotes other post-translational modifications of ER, such as ubiquitination and sumoylation (144, 171). Thus, AF-1 emerges as a key target domain for protein kinase-regulated events to achieve distinct as well as concerted transcriptional actions with AF-2.

The peptidylprolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) Pin1 binds specifically phosphorylated Ser/Thr-Pro motifs to induce conformational changes of target proteins (361). To achieve its enzymatic activity, Pin1 acts through two functional domains, a WW domain which functions as a binding interface specific for pSer/pThr-Pro motifs, and a PPIase catalytic domain responsible for *cis-trans* isomerization of the bond N-terminal to the proline residue, allowing for structural change of conformation (370, 395, 482). Among the functional consequences of targets modified by Pin1-induced isomerization are notably changes in protein stability, phosphorylation status, protein-protein interaction, and subcellular localization (361, 483). In addition, a number of studies have shown that tumorigenesis is associated with alterations of protein function caused by Pin1 isomerization (361, 484-486). Pin1 overexpression was found in various human cancers, including breast cancer (487) and Pin1-mediated activation of oncoproteins and inactivation of tumor suppressors was reported (414). For example, Pin1 activity contributed to downregulate tumor suppressors Runx3 (392) and PML (391), leading to increased proliferation of breast cancer cells. Pin1 potentiation of breast cancer cell growth was also linked to cooperating with

Ras signaling (414), and components important for tumor development, such as cyclin D1, cyclin E and c-Myc, were upregulated by Pin1 (488). Recently, Pin1 was shown to target phosphorylated ER α , and regulating coactivator SRC-3 recruitment, resulting in enhanced proliferation of breast cancer cells (397, 489). These studies therefore provide an oncogenic potential to Pin1.

ER β is known to become highly phosphorylated at various sites in response to kinase signalling pathways (40). In particular, we have previously identified AF-1 Ser-87 of ER β as a conserved mitogen-activated protein kinase site which directs SRC-1 coactivator recruitment and ligand-independent transcriptional activation of ER β in response to growth factor signalling (106). More recently, ER β Ser-87 phosphorylation was shown essential in mediating a feed-forward regulation of ER β with the chemokine CXCR4/SDF-1 axis in breast cancer cells (117). Here, we found that Pin1 targets ER β upon specific phosphorylation of Ser-87 recognized by the WW domain of Pin1. Such recruitment results in ER β transcriptional activation and enhanced migration potential of breast cancer cells, revealing Pin1 as an important regulator of ER β function in context of enhanced kinase signalling pathways.

Results

Pin1 interacts with ER β

To explore the possible role of Pin1 as a regulator of ER β , we first examined the Pin1 expression in human breast cancer cells, such as the ER-negative Hs578t and the ER-positive MCF-7 cells, which both showed high levels of expression (Fig. 1A). As expected, ER β is expressed in MCF-7 cells while not in Hs578t cells. We then addressed whether Pin1 can be recruited to ER β . We found that ER β co-immunoprecipitated with endogenous Pin1 in MCF-7 cells, suggesting that ER β might interact with Pin1 (Fig. 1B). To avoid any possible role of ER α , which was also reported to interact with Pin1 in the context of MCF-7 cells (397) we also used ER-negative cell line transfected with ER β , which showed a strong recruitment of Pin1 as compared to control cells (Fig. 1C). Such interaction between ER β and Pin1 was further enhanced in response to 17 β -estradiol.

Pin1 upregulates ER β

We next addressed the effect of Pin1 on the transcriptional competence of ER β . To assess for direct ER β transcriptional activity, we used ER β stably expressing cells (Hs-ER β) generated from parental Hs578t cells and functionally validated for ER β expression and estrogenic responsiveness compared to mock-stable Hs-Ctl cells (49). In luciferase assay, Pin1 expression in Hs-ER β cells caused a dose-dependent augmentation of ER β activity in response to estrogen, reaching a near 3-fold increase compared to treated cells not transfected with Pin1 (Fig. 2A). Estrogen-regulated target gene expression was also monitored on known ER β target genes (49),

117). Pin1 contributed to further induce the estrogen upregulation of CXCL12 and TFF1 genes in Hs-ER β cells compared to Hs-Ctl cells which remained unresponsive (Fig. 2B). Interestingly, Pin1 also induced although to a lesser extent, the ligand-independent activity of ER β (Fig. 2A and B). These results support a functional role of Pin1 in upregulating ER β transcriptional activity and hormone-responsive gene expression.

The WW domain of Pin1 and ER β Ser-87 are required for Pin1 regulation of ER β

We next determined the role of functional domains of Pin1 in the upregulation of ER β activity. Pin1 contains a N-terminal WW domain that allows interaction with phosphorylated substrates through side chain specificity and a C-terminal PPIase domain for isomerase activity (361, 490). Using point mutants, we found that the catalytic-inactive K63A mutant impaired Pin1 upregulation of ER β activity and the WW-defective W34A completely abolished the effect of Pin1 (Fig. 3A). These results suggest that the positive regulation of ER β by Pin1 requires its WW domain and involves Pin1 isomerase activity.

Given the requirement of phosphorylated Ser-Pro motifs to interact with Pin1 and undergo *cis-trans* isomerization, we tested various serine residues known to be phosphorylated by Pro-directed kinases and regulate ER β function (40) We found that mutation of Ser-87 (S87A) completely abolished the ligand-independent and estrogen-induced transcriptional activation of ER β in response to Pin1 (Fig. 3B). However, mutation of Ser-6 and Ser-12 contained within Ser-Pro motifs, and also Ser-8 identified as a target of GSK-3 β (144), did not impair the effect of Pin1 on ER β activity. We have previously reported that Ser-87 of ER β can be phosphorylated

by Erk kinase, providing ER β activation potential (117). Given the requirement of Ser-87 for the enhanced recruitment of Pin1 to ER β in response to estrogen, we tested Ser-87 phosphorylation in this process. Our results show increased phosphorylation levels of Ser-87 in conditions of Pin1 expression in transfected Hs578t cells compared to control cells (Fig. 4C). In addition, ER β Ser-87 phosphorylation was further enhanced when cells were treated with estrogen. These results identify Ser-87 as a required target for Pin1 to interact with ER β , and provide a regulatory role of Ser-87 phosphorylation in the ER β response to Pin1.

Pin1 increases the stability of ER β

Pin1 regulation of protein function often involves a change in protein stability (483). The positive correlation between ER β and Pin1 expression and the ability of Pin1 to up-regulate ER β incited us to investigate whether ER β turnover was affected by Pin1. Over expression of Pin1 strongly increased the steady-state levels of ER β , suggesting an effect on stability (Fig.4A). To address whether Ser-87 was required, we generated stable ER β -S87A expressing cells (Hs-S87A) in the context of parental Hs-578t cells. Hs-S87A cells showed little effect on the cellular levels of ER β indicating an essential role of Ser-87 (Fig.4A). To determine whether ER β degradation rate was affected by Pin1, we performed chase experiments in Hs-ER β compared to Hs-S87A cells. Pin1 expression strongly increased the half-life of ER β ($t_{1/2} > 12\text{h}$ vs $t_{1/2} = 8\text{h}$ without Pin1; Fig. 4B and C). However, such increase in ER β turnover rate was strongly impaired in Hs-S87A cells ($t_{1/2} = 6.2\text{h}$ vs $t_{1/2} = 5.4\text{h}$ without Pin1). This suggests that Pin1

regulates ER β turnover in cells, and that Ser-87 plays an essential role in mediating the effect of Pin1 on ER β stability.

Pin1 increases the ER β -induced migration of breast cancer cells

We next wanted to determine the potential of Pin1 to affect cell migration in the context of ER β expression using a cell scratch wound healing assay. Overexpression of Pin1 had little effect on migration of Hs-Ctl cells over a period of 24h (Fig. 5A). However, Hs-ER β cells showed an increased mobility in response to Pin1 expression, which was further induced in presence of estrogen (Fig. 5B). This increasing effect of Pin1 on cell migration was not observed in Hs-S87A cells, indicating the requirement of Ser-87 in the response of ER β to Pin1. These data suggest a potential to Pin1 to induce ER β positive effect on cell mobility in response to estrogen. As the epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in tumor metastasis (491-493), we also analyzed the gene expression of components related to EMT, such as the epithelial markers CDH1 (E-cadherin), and the mesenchymal markers CDH2 (N-cadherin), SNAI2 (Slug) and SNAI1 (Snail). Overexpression of Pin1 contributed to increase in absence or presence of estrogen the mRNA levels of SNAI1, SNAI2 and CDH2, while decreasing those of CDH1 in Hs-ER β cells (Fig. 5C). However, the potentiation effect of Pin1 and estrogen was not observed under the same conditions using Hs-S87A cells. These results suggest that Pin1 increases the potential of ER β to upregulate the gene expression of EMT markers and that Ser-87 is required for these effects.

Discussion

This study identifies the peptidyl prolyl isomerase Pin1 as a recruiting cofactor of ER β to increase estrogenic responsiveness of ER β in breast cancer cells. Pin1 recruitment requires specific phosphorylation of ER β at Ser-87, an important regulatory site targeted by estrogen signalling and kinase pathways (40), resulting in increased ER β transcriptional activity and cell migration potential. The ability of Pin1 to promote estrogen-mediated regulation of ER β through Ser-87 phosphorylation supports a role for ER β AF-1 activation in the control of breast cancer cell mobility.

The peptidyl prolyl isomerase Pin1 regulates protein function by binding phosphorylated Ser/Thr-Pro motif of substrates primarily via its WW domain, establishing direct contact with pSer/Thr-Pro motifs. Pro-directed Ser/Thr phosphorylation is considered a common signalling mechanism in cell proliferation and transformation. Cyclin-dependent kinases (CDK) and mitogen activated protein kinases (MAPKs) are the major proline-directed kinases mediating the phosphorylation of Ser/Thr-Pro motifs of Pin1 substrates (494). ER β is extensively phosphorylated by a variety of kinases including MAPK/Erk, Jnk, and p38 that play important roles in regulating the function of ER β (40). In particular, Ser-6 and Ser-12 were shown to be phosphorylated by Erk to establish a proper negative interface known as pSuM to conjugate SUMO isoforms to ER β (144). In addition, we have previously identified Ser-87 as a conserved target site of Erk which directs ligand-independent transcriptional activation of ER β in response to growth factor signalling (106). In this study, Ser-6 and Ser-12 do not seem to be involved in Pin1 regulation of ER β , but we identified pSer-87 as an essential site specifically recognized by Pin1 and required to mediate Pin1 activation of ER β . Mutation of Ser-87 to alanine completely

abolished the response of ER β to Pin1 in breast cancer cells. This raises the question of how Pin1 promotes activity of ER β at this serine. Ser-87 is located in the AF-1 domain, a region shown to be important for ER β turnover and activation (40, 144). Following Ser-87 phosphorylation, transcriptional coactivators such as steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) and histone acetyl transferase CREB binding protein (CBP) are recruited, resulting in transcriptional activation of ER β (106, 170). After phosphorylation of Ser/Thr-Pro motifs by proline-directed kinases, Pin1 acts as post-phosphorylation regulator by changing the conformation of its target proteins through its *cis-trans* isomerase activity (361). The isomerase activity of Pin1 was found essential to mediate activation of ER β through Ser-87, suggesting that binding of Pin1 to ER β might induce the *cis-trans* isomerization of the pSer-87-Pro peptidic bond. It is tempting to speculate that such shift in *trans* isomer configuration might then induce a conformational change of ER β highly favourable for coactivator recruitment. Consistent with this, the unique configuration of pSer/Thr-Pro motifs is known to dictate conformation-specific interactions with phosphorylation-dependent regulators such as phosphatases and F-box ubiquitin ligases (366, 495). As such, Pin1 effect towards ER β can be envisioned as a molecular switch that synchronously coordinates pSer-87-mediated AF-1 activity through proper isoform-specific changes.

We show that Pin1-induced isomerization of ER β at pSer-87-Pro motif increased the transcriptional potential of ER β with upregulation of target genes such as TFF1 and CXCL12. CXCL12 encodes the chemokine SDF-1 which upon interaction with its cognate cytokine receptor CXCR4 can initiate cell chemotaxis and migration in a number of cancer types (117,

289, 291, 311, 342, 344-350, 445). We previously identified Ser-87 as a responsive site to SDF-1 signaling, which becomes phosphorylated and trigger ER β activation and upregulation of responsive genes including CXCL12 (117). Such transcriptional regulation was shown to support a feed-forward mechanism of ER β activation with the chemokine CXCR4/SDF-1 axis, which would program breast cancer cells into a metastatic profile (40, 117). Our data showed that Pin1 further induce the ER β -regulation of CXCL12 gene by estrogen, suggesting that Pin1 might potentiate the feedback regulation of ER β and the CXCL12 axis in breast cancer cells. Estrogenic regulation of CXCL12 gene expression can also occur through ER α (117, 445), and Pin1 was also reported to regulate the turnover and activity of ER α through Ser-118 phosphorylation (404, 496, 497), which provides a role of Pin1 to upregulate ER α in breast cancer cells. Our data do not exclude such regulation of ER α to Pin1 as a committing step into a feed-forward mechanism involving the CXCL12/CXCR4 axis for breast cancer progression, and in such case, it would be interesting to address the role of Pin1 in the ER α /CXCL12 regulation pathway (40, 117). Here we show that Pin1-dependent isomerization of ER β under the control of Ser-87 phosphorylation is sufficient to program breast cancer cells into a migratory phenotype.

Pin1 is highly overexpressed in several human cancers including breast cancer, and its expression levels correlate with malignancy (361). In breast cancer, deregulation of Pin1 expression occurs in response to growth factors and other stimulating conditions such as ErbB2/Her2 or Ras activation (498). We observed that overexpression of Pin1 led to an increase in the migration potential of ER β -expressing Hs-578t breast cancer cells in response to estrogen and that Pin1 failed to induce a similar effect in conditions of ER β Ser-87 disruption. In such

conditions, we show that phosphorylation of ER β Ser-87 is enhanced in response to estrogen, providing the necessary recruiting signal for Pin1 interaction. It is noteworthy that Pin1 can indirectly regulate Erk through action on Erk-upstream protein kinases (378) a process that might also participate in ER β Ser-87 phosphorylation (40). Cancer cell metastasis is assured by the detachment of cells from their origin tissue and migration to another organ through changes in the epithelia-mesenchymal transition (EMT) pathway (499, 500). E-cadherin, the main epithelial cell-cell adhesion molecule, is down regulated in breast cancer and used as a tumor type marker (501). E-cadherin (CDH1) expression is repressed by the transcriptional factors Snail (SNAI1) and Slug (SNAI2), which are also essential markers of the EMT pathway (502, 503). Our data showed that overexpression of Pin1 enhanced the gene expression of mesenchymal markers SNAI1, SNAI2, and CDH2 (Vimentin) in Hs-ER β cells in response to estrogen, supporting the migration phenotype of cells. Estrogen is known to promote the regulation of EMT pathway by down-regulating E-cadherin and inducing vimentin, a process mainly associated to ER α activation (504). The role of ER β is however less clear in such regulation and was even recently considered to exert a negative effect on EMT, supporting anti-metastatic property of ER β in breast cancer (205). Our results suggest that in the context of ER β expression, the Pin1-induced isomerization at Ser-87-Pro might be sufficient to promote favourable ER β conformational changes and sustain AF-1-induced expression of estrogenic genes. This is consistent with the reported role of Ser-87 phosphorylation in triggering estrogen-responsive genes and metastatic behaviour of human breast cancer cells through the coupling of ER β with the chemokine pathway (117). The identification of Pin1 as a novel regulator of ER β function and its impact on ER β -expressing breast cancer cell phenotype warrant further

investigation of the role and therapeutic potential of Pin1 in the treatment of endocrine-resistant breast cancers.

Materials and methods

Cell culture

Human Hs-578t and MCF-7 breast cancer cell lines were maintained in DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Before and during the E2 treatment, cells were maintained in phenol red-free DMEM with 10% dextran-coated charcoal-treated FBS.

RNA isolation and quantitative PCR

Total RNA was extracted from cell lines and complementary DNA was synthesized as described (505). Gene expression was measured by qPCR using SyBr Green qPCR master mix (Applied Biosystems). The primer sequences used for genes specific are available on request. Expression values were normalized to RPLP0 gene used as an internal control, and results were obtained from at least three independent experiments performed in duplicates.

Western blot analysis

Cells were harvested in TBS lysis buffer containing 0.1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease

inhibitors cocktail (Sigma). Protein extracts were subjected to SDS-PAGE followed by electrotransfer onto nitrocellulose membrane. Membranes were incubated with primary antibodies, followed by horseradish peroxidase-linked secondary antibody, and visualized with ECL detection reagent. Antibodies used were for ER β and ER α -pSer87 (Santa Cruz), Erk1/2, pErk1/2 and β -actin (Cell Signaling).

Luciferase assay

Luciferase assays were done as described previously using an EREbLuc reporter (171). Cells were treated for 18 to 20 h with vehicle or 10 nM 17 β -estradiol (E2). Values are normalized to β -galactosidase activity and expressed as relative luciferase units (RLU) or fold response derived from at least three independent experiments performed in triplicate.

Cycloheximide chase

Hs-ER β cells were transfected with plasmids expressing Myc-tagged wild-type or S87ER β in absence or presence of Pin1 plasmid. At 12 hours after transfection, cycloheximide (Sigma) was added at a concentration of 50 μ M and cells were lysed for Western blot analysis at the indicated time points. Each signal intensity derived from two separate experiments was quantitated using an image analyzer (Alpha Innotech, San Leandro, CA) and expressed relative to β -actin levels.

Wound scratch assay

Stable Hs-ER β and Hs-S87A cells were seeded at 80–90% confluence and allowed to form a monolayer for 24h in culture medium. Linear wounds were then made with a sterile 10 μ l plastic pipette tip. The cell surface was washed three times with PBS to remove dislodged cells and cells were then treated with either ethanol vehicle (-) or 10nM E2 for 12-24h. Microscopic images of wounds were captured (Zeiss) at 10 \times magnification at the predetermined wound closure location.

References

1. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 2008;6:e003.
2. Marquette C, Nabell L. Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer. *Current treatment options in oncology*. 2012;13(2):263-75.
3. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast cancer research and treatment*. 2006;96(2):131-46.
4. Yue F, Zhang GP, Jin HM. Effects of basic fibroblast growth factor on the expressions of angiogenic gene profile and cyclooxygenase-2 in brain microvascular endothelial cells. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*. 2006;58(2):124-8.
5. Gothlin Eremo A, Tina E, Wegman P, Stal O, Fransén K, Fornander T, et al. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. *Int J Oncol*. 2015;47(4):1311-20.
6. Stires H, Heckler MM, Fu X, Li Z, Grasso CS, Quist MJ, et al. Integrated molecular analysis of Tamoxifen-resistant invasive lobular breast cancer cells identifies MAPK and GRM/mGluR signaling as therapeutic vulnerabilities. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017.
7. Tian M, Schiemann WP. TGF-beta Stimulation of EMT Programs Elicits Non-genomic ER-alpha Activity and Anti-estrogen Resistance in Breast Cancer Cells. *J Cancer Metastasis Treat*. 2017;3:150-60.
8. Vethakanraj HS, Sesurajan BP, Padmanaban VP, Jayaprakasam M, Murali S, Sekar AK. Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ERalpha. *Anticancer Drugs*. 2018;29(1):50-60.
9. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(2):104-10.
10. Goldhirsch A. What are the long-term effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer? : Nature Publishing Group.
11. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(4):557-68.
12. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, Osborne CK, Fuqua SA. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(22):7490-9.
13. Zhao C, Lam EW, Sunters A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC, et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene*. 2003;22(48):7600-6.
14. Treeck O, Juhasz-Boess I, Latratch C, Horn F, Goerse R, Ortmann O. Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 2008;110(3):507-20.
15. Markey GC, Cullen R, Diggin P, Hill AD, Mc Dermott EW, O'Higgins NJ, et al. Estrogen receptor-beta mRNA is associated with adverse outcome in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2009;30(4):171-5.

16. Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ, Atkin SL. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer research*. 1999;59(21):5421-4.
17. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*. 1992;11(3):1025-33.
18. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular cell*. 1999;3(4):513-9.
19. Warnmark A, Wikstrom A, Wright AP, Gustafsson JA, Hard T. The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):45939-44.
20. Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001;77(1):19-27.
21. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(14):2709-21.
22. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22(2):317-30.
23. Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):904-16.
24. Jager M, Zhang Y, Bieschke J, Nguyen H, Dendle M, Bowman ME, et al. Structure-function-folding relationship in a WW domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(28):10648-53.
25. Yeh ES, Means AR. PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):381-8.
26. Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP. Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;56(9-10):788-806.
27. Liou YC, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(10):501-14.
28. Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer research*. 2003;63(19):6244-51.
29. Leung KW, Tsai CH, Hsiao M, Tseng CJ, Ger LP, Lee KH, et al. Pin1 overexpression is associated with poor differentiation and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2009;21(4):1097-104.
30. Ryo A, Uemura H, Ishiguro H, Saitoh T, Yamaguchi A, Perrem K, et al. Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(20):7523-31.
31. Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *The American journal of pathology*. 2004;164(5):1727-37.

32. Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* 2001;20(13):3459-72.
33. Nicole Tsang YH, Wu XW, Lim JS, Wee Ong C, Salto-Tellez M, Ito K, et al. Prolyl isomerase Pin1 downregulates tumor suppressor RUNX3 in breast cancer. *Oncogene.* 2013;32(12):1488-96.
34. Reineke EL, Lam M, Liu Q, Liu Y, Stanya KJ, Chang KS, et al. Degradation of the tumor suppressor PML by Pin1 contributes to the cancer phenotype of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Molecular and cellular biology.* 2008;28(3):997-1006.
35. Lu Z, Hunter T. Prolyl isomerase Pin1 in cancer. *Cell research.* 2014;24(9):1033-49.
36. Rajbhandari P, Finn G, Solodin NM, Singarapu KK, Sahu SC, Markley JL, et al. Regulation of estrogen receptor alpha N-terminus conformation and function by peptidyl prolyl isomerase Pin1. *Molecular and cellular biology.* 2012;32(2):445-57.
37. Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, et al. Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Molecular and cellular biology.* 2005;25(21):9687-99.
38. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer research.* 2009;69(14):5793-800.
39. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(7):4830-40.
40. Lu PJ, Zhou XZ, Liou YC, Noel JP, Lu KP. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277(4):2381-4.
41. Borgna S, Armellini M, di Gennaro A, Maestro R, Santarosa M. Mesenchymal traits are selected along with stem features in breast cancer cells grown as mammospheres. *Cell Cycle.* 2012;11(22):4242-51.
42. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2010;15(2):253-60.
43. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704-15.
44. Schutkowski M, Bernhardt A, Zhou XZ, Shen M, Reimer U, Rahfeld JU, et al. Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry.* 1998;37(16):5566-75.
45. Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, Sicheri F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell.* 2003;112(2):243-56.
46. Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, et al. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular cell.* 2000;6(4):873-83.

47. Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, et al. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e20898.
48. Guo Q, Gao BL, Zhang XJ, Liu GC, Xu F, Fan QY, et al. CXCL12-CXCR4 Axis Promotes Proliferation, Migration, Invasion, and Metastasis of Ovarian Cancer. *Oncol Res*. 2014;22(5-6):247-58.
49. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(5):792-803.
50. Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecologic oncology*. 2006;103(1):226-33.
51. Li M, Ransohoff RM. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(2):111-5.
52. Mao TL, Fan KF, Liu CL. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in treating epithelial ovarian cancer. *Gene Ther*. 2017;24(10):621-9.
53. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-6.
54. Popple A, Durrant LG, Spendlove I, Rolland P, Scott IV, Deen S, et al. The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(7):1306-13.
55. Salomonsson E, Stacer AC, Ehrlich A, Luker KE, Luker GD. Imaging CXCL12-CXCR4 Signaling in Ovarian Cancer Therapy. *PLoS One*. 2013;8(1).
56. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer research*. 2001;61(13):4961-5.
57. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research*. 2002;62(20):5930-8.
58. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):709-22.
59. Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1999;13(9):1522-34.
60. Rajbhandari P, Finn G, Solodin NM, Singarapu KK, Sahu SC, Markley JL, et al. Regulation of Estrogen Receptor α N-Terminus Conformation and Function by Peptidyl Prolyl Isomerase Pin1. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(2):445-57.
61. Rajbhandari P, Schalper KA, Solodin NM, Ellison-Zelski SJ, Ping Lu K, Rimm DL, et al. Pin1 modulates ER α levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene*. 2014;33(11):1438-47.
62. Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(15):5281-95.
63. Park JE, Lee JA, Park SG, Lee DH, Kim SJ, Kim HJ, et al. A critical step for JNK activation: isomerization by the prolyl isomerase Pin1. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):153-61.
64. Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2012.

65. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
66. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *The American journal of pathology*. 1993;143(6):1731-42.
67. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9.
68. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76-83.
69. Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, et al. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol*. 2007;9(4):470-8.
70. Voutsadakis IA. Hormone Receptors in Serous Ovarian Carcinoma: Prognosis, Pathogenesis, and Treatment Considerations. *Clin Med Insights Oncol*. 2016;10:17-25.
71. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology*. 2007;148(3):1009-18.

Figure Legends

Figure 1. Pin1 interacts with ER β in breast cancer cells. **A-** Western blot analysis of ER β and Pin1 in human Hs-578t and MCF-7 breast cancer cells. **B-** Recruitment of ER β to Pin1. Immunoprecipitation (IP) of MCF-7 cell lysates was carried out with an anti-Pin1 antibody, and ER β was detected by Western analysis. IgG was used as a negative IP control. Input controls were also monitored from whole-cell lysates. **C-** Estrogen increases recruitment of Pin1 to ER β . Stably ER β -expressing Hs578t cells (Hs-ER β) were transfected with Myc-tagged Pin1 and then treated or not (vehicle) with 10nM 17 β -Estradiol (E2). Mock-stable Hs578t cells (Hs-Ctl) were used as a negative control. Immunoprecipitation was carried out with an anti-Myc antibody and ER β analyzed by Western blot. Input levels were also monitored from whole-cell lysates.

Figure 2. Pin1 induces ER β transcriptional activity. **A-** Transcriptional activation of ER β by Pin1. Stable Hs-ER β cells were transfected with increasing amounts of Pin1 plasmid in the presence of an ERE₃bLuc reporter and then treated or not with 10nM E2 for 16h. Each luciferase activity value was normalized to β -galactosidase and expressed as mean \pm SEM compared to untreated cells set at 1.0. **B-** Pin1 induces ER β -dependent target gene expression. Real-time PCR analysis was performed on ER responsive genes in stable Hs-ER β cells treated or not with 10nM E2. Results are normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to untreated Hs-Ctl cells, which was set at 1.0. Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicates.

Figure 3. Pin1-induced activation of ER β requires the WW domain and is dependent on ER β Ser-87. **A-** The WW domain of Pin1 is required to activate ER β . Hs-ER β cells were transfected with either wild-type, W34A or K63A mutated Pin1 in the presence of an ERE₃bLuc reporter, and then treated or not with 10nM E2 for 16h. Each luciferase activity value was normalized to β -galactosidase and expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicates compared to untreated cells set at 1.0. **B-** Pin1-induced ER β activation is mediated by Ser-87. Hs-ER β were transfected with various ER β serine mutants at position 6, 8, 12, and 87, and then analyzed as in (A).

Figure 4: Pin1 regulates ER β protein stability through Ser-87. **A-** Pin1 increase of ER β protein levels is dependent of Ser-87. Stable Hs-ER β and Hs-S87A cells were transfected with Pin1 and then subjected to Western blot analysis. **B-** Ser-87 mediates the increased ER β stability to Pin1. Cells were transfected as in (A) and subjected to a cycloheximide chase. Representative blots are shown for ER β and S87A expressing stable cells. **C-** Estrogen increases phosphorylated Ser-87 ER β levels. Hs-578t cells were transfected with ER β with or without Pin1 and treated with 10 nM E2 for 30min. Cell were then analyzed by Western blot. **D-** Corresponding quantitation of signal intensity of ER β and S87A mutant derived from three separate experiments of cycloheximide chase experiments such as in (B). Results were normalized to β -actin content and expressed as the percentage change of time zero, which was set at 100%.

Figure 5: Pin1 induces cell migration and mesenchymal markers through ER β Ser-87. **A-** Control experiments using stable Hs-Ctl cells transfected or not with Pin1 and subjected to a scratch wound-healing analysis. **B-** The ER β -induced cell migration is dependent on Ser-87. Wound-healing assay performed as in (A) except that stable Hs-ER β and Hs-S87A cells were used. Cells were also treated or not (-) with 10nM E2 for 12h.

Figure 6: Expression levels of EMT genes in Hs-ER β and Hs-S87A cells. Cells were transfected with Pin1 and then treated or not with 10nM E2 for 12h. Data are represented as mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicates.

Fig. 1

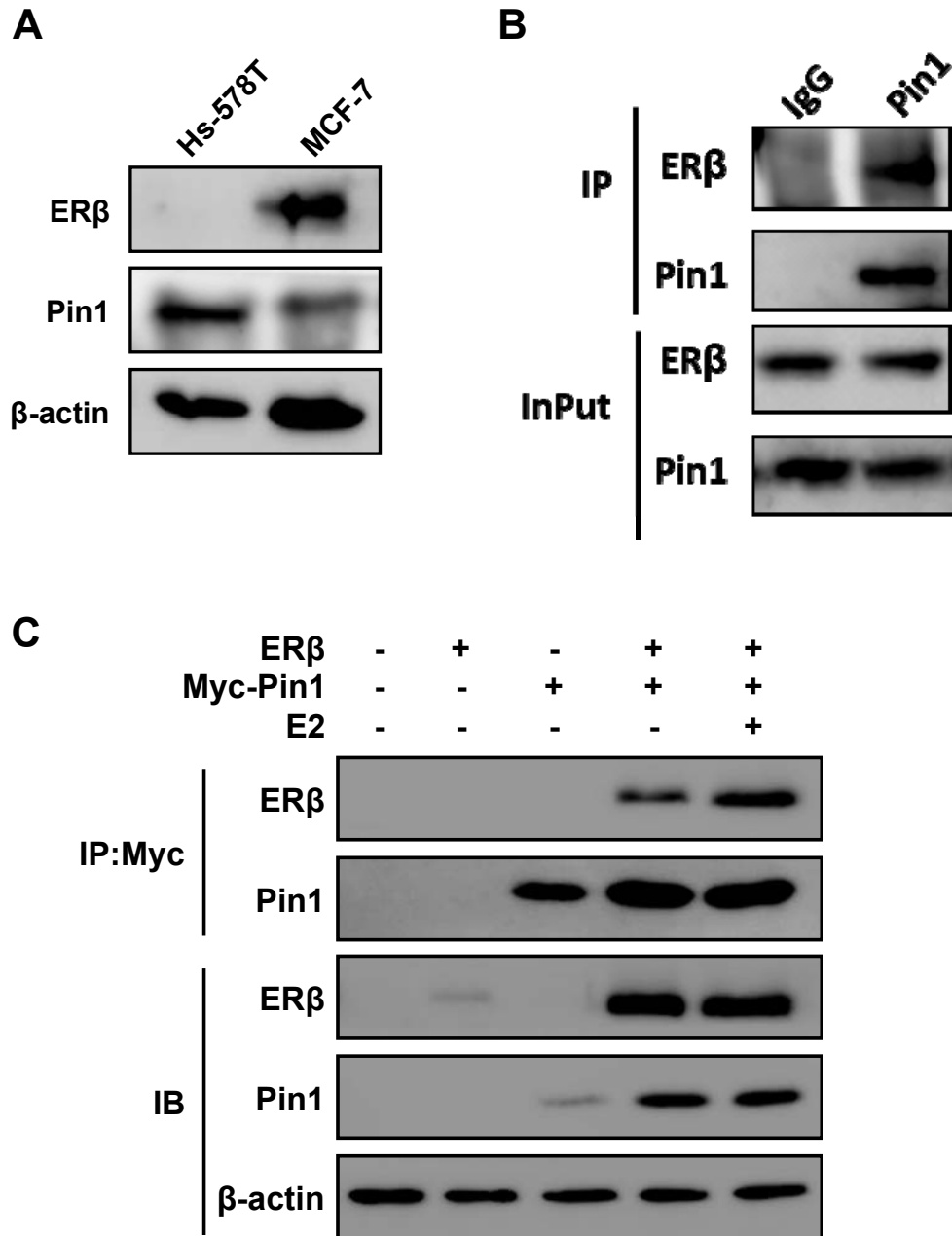
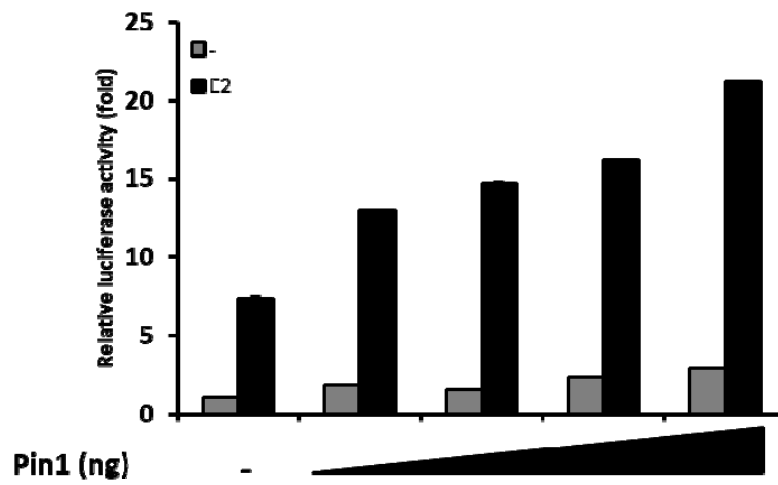


Fig. 2

A



B

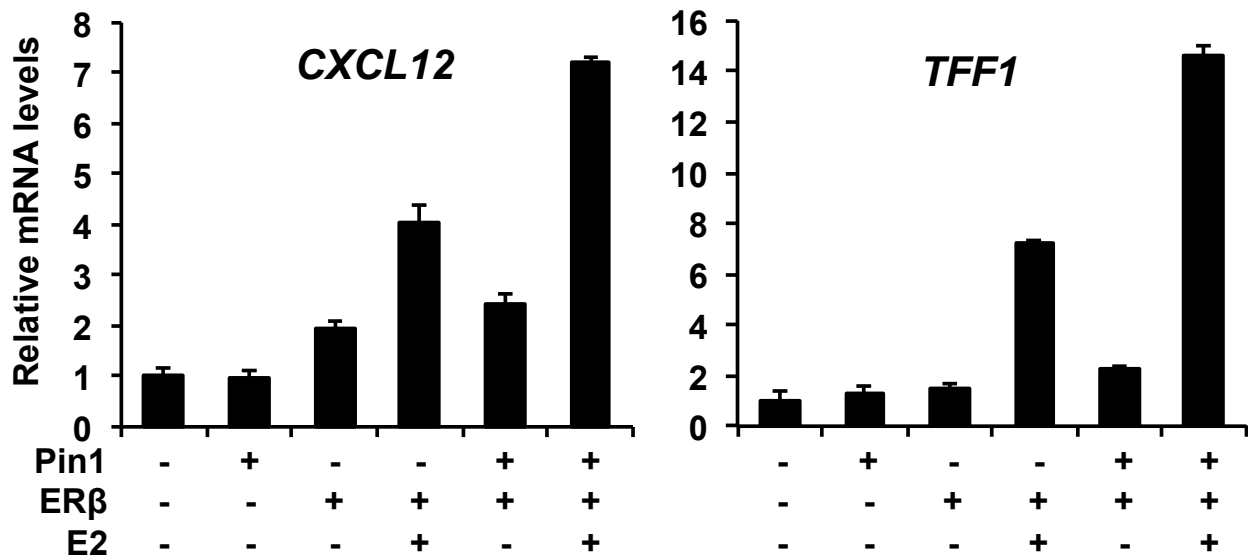
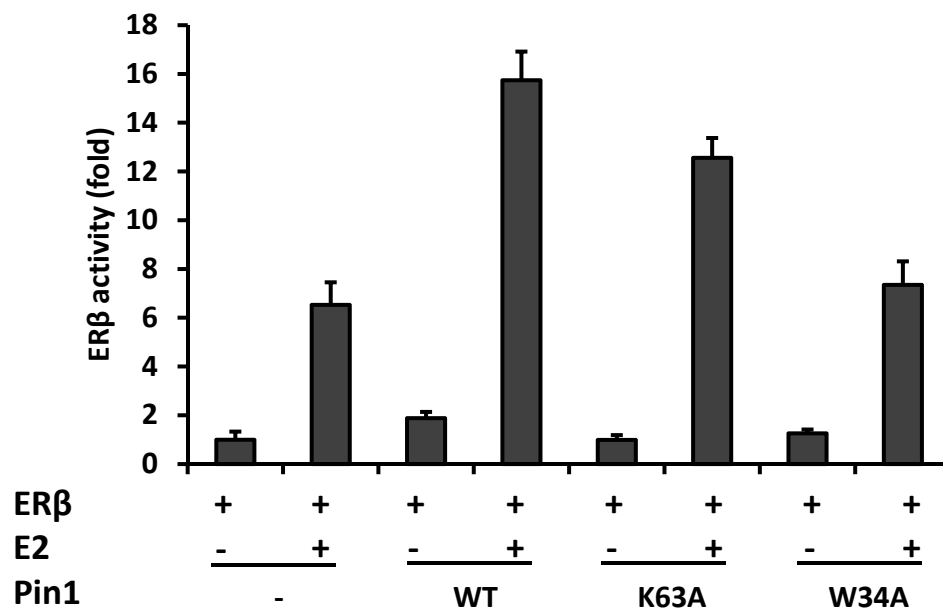


Fig. 3

A



B

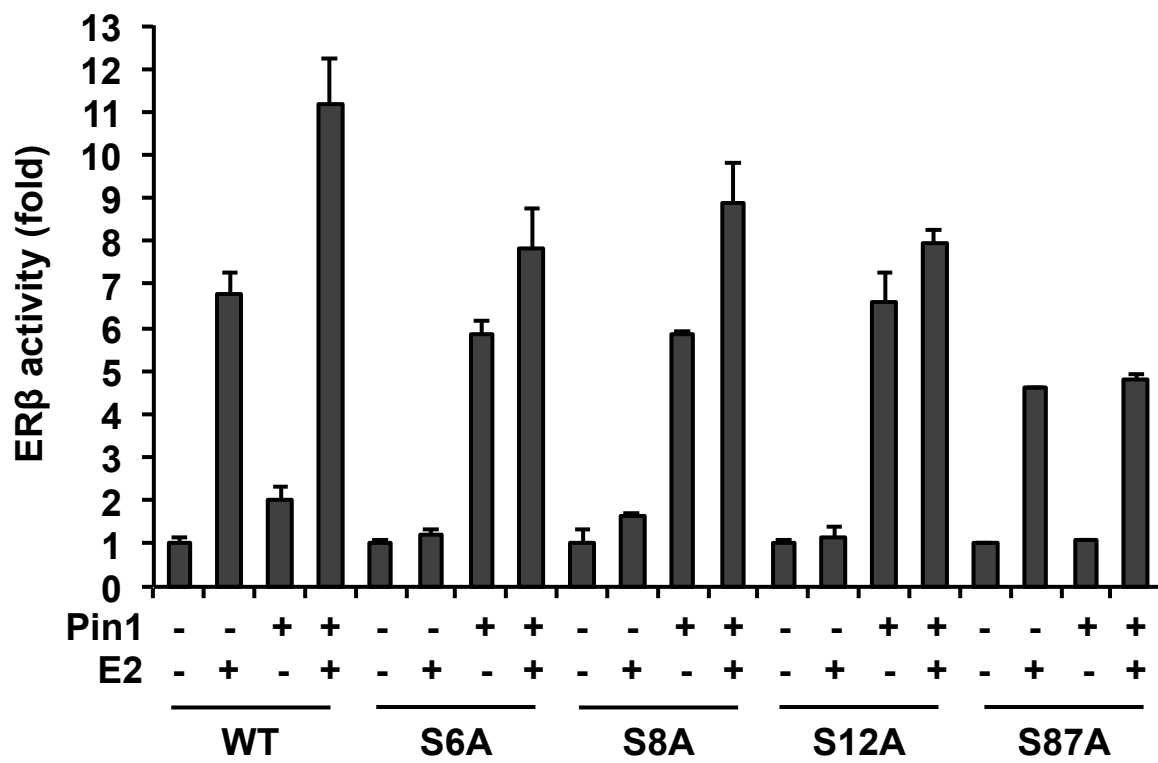


Fig. 4

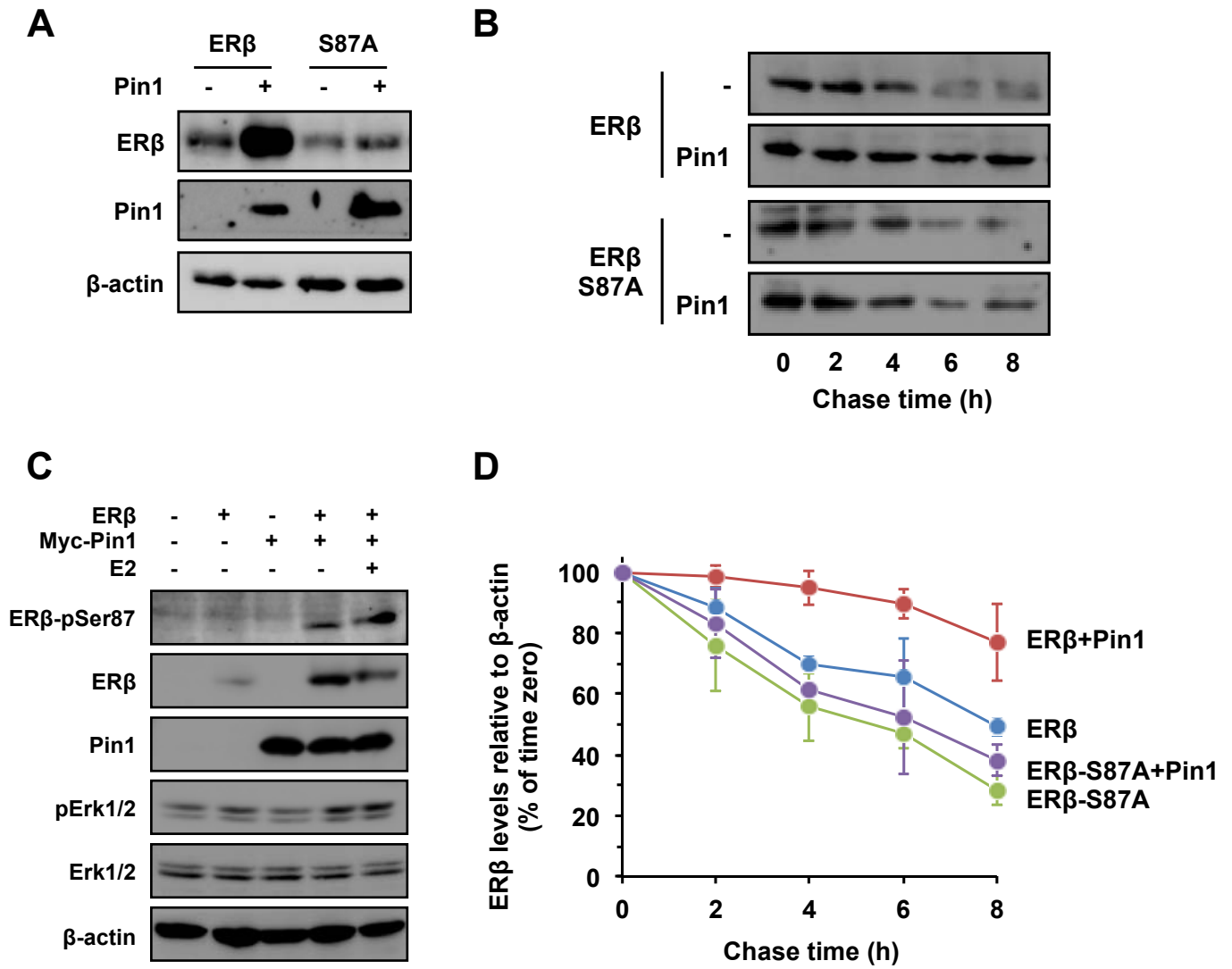
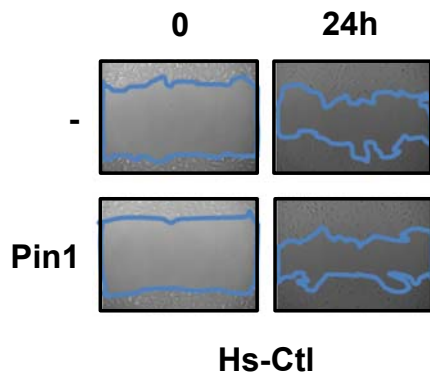


Fig. 5

A



B

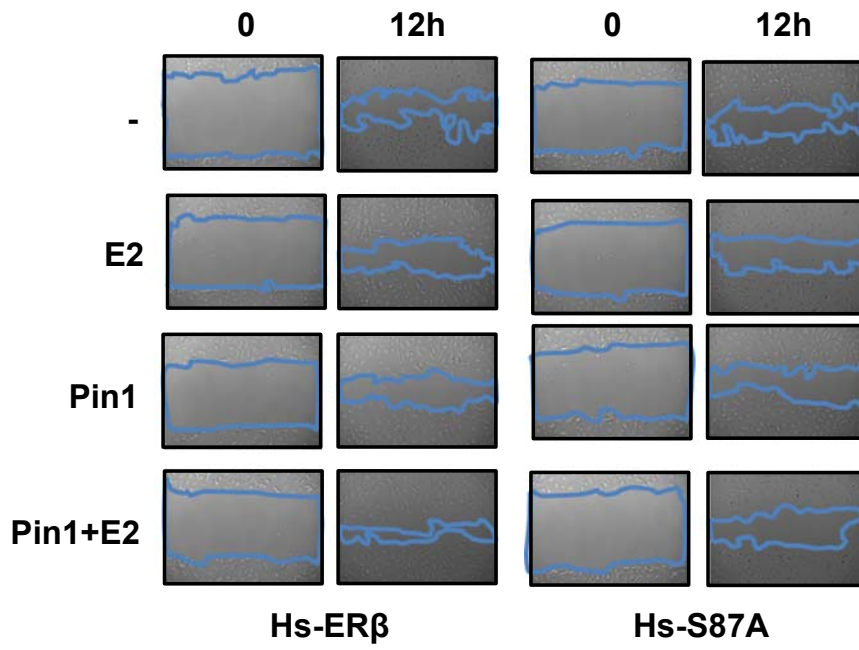
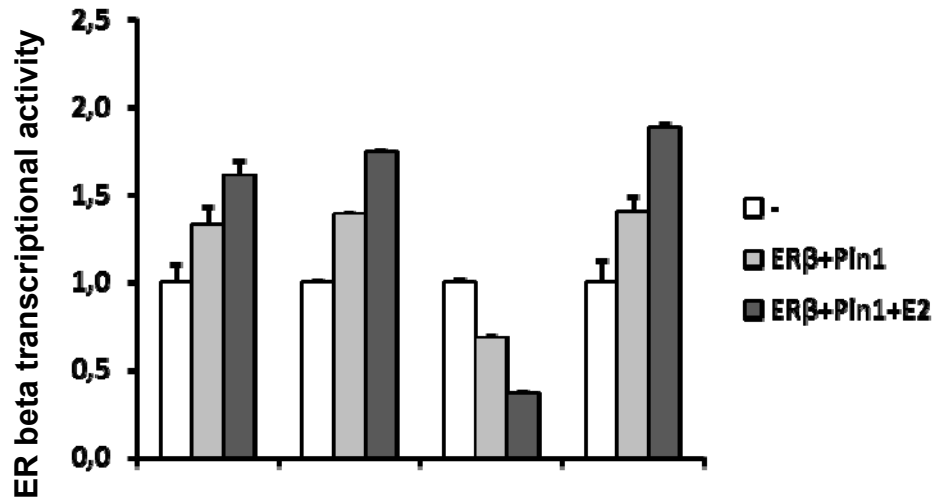


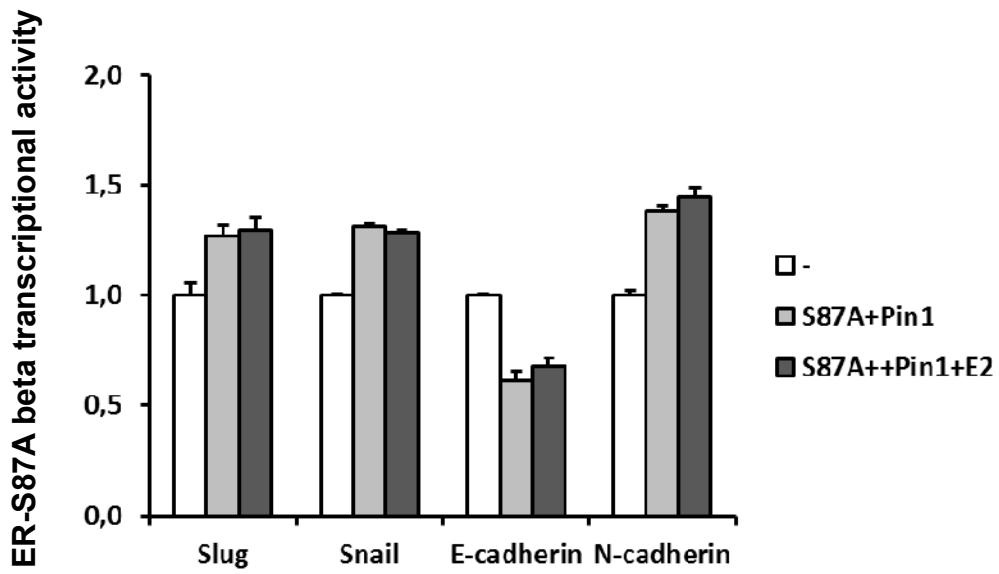
Fig. 6

A



B

ER beta transcriptional activity



Chapitre 3 Discussion générale, perspectives et conclusion

Discussion

1. Contrôle par rétroaction positive de l'axe des chimiokines CXCR7 par le récepteur des estrogènes

1.1.L'expression du gène CXCR7 est régulée par l'estrogène et ER α

Le récepteur CXCR7, nouvellement découvert, est fortement exprimé dans le processus du développement biologique. Récemment, de nombreuses études ont démontré le rôle favorable de CXCR7 dans la croissance cellulaire et les métastases dans divers cancers. Compte tenu du fait que CXCR7 soit surexprimé dans de nombreuses cellules tumorales, il serait intéressant d'explorer le mécanisme qui conduit à l'expression de CXCR7. Malheureusement, ce mécanisme n'est pas encore clairement compris. Antérieurement, notre groupe a confirmé que l'expression de SDF-1, le ligand de CXCR4 et de CXCR7, est régulé à la hausse par E2 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, qui expriment ER α et ER β . Plusieurs études ont rapporté le rôle important que joue SDF-1 et le récepteur CXCR4 dans la prolifération, la migration, l'invasion et la métastase péritonéale des cellules cancéreuses ovariennes *in vitro* et

in vivo (321, 456, 506, 507). Très peu de données sont disponibles au sujet de l'implication de CXCR7 dans le cancer de l'ovaire. Cependant, les résultats d'une étude récente laissent entendre que l'axe SDF-1/CXCR7 favorise l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire par l'expression de MMP-9 à travers la voie MAPK p38 (351). Les mécanismes régulant l'expression de CXCR7 sont complexes et peu clairs. Le VEGF régule positivement CXCR7 dans les cellules du carcinome hépatocellulaire humain et que l'expression améliorée de CXCR7 par VEGF est fonctionnelle. De plus, la croissance tumorale et l'angiogenèse sont supprimées par knockdown de CXCR7 *in vivo* suggérant l'importance de CXCR7 dans l'invasion et l'angiogenèse du carcinome hépatique (457). Dans les cellules cancéreuses de la prostate, l'expression de CXCR7 est régulée par IL-8. En culture cellulaire, l'expression d'IL-8 augmente sélectivement l'expression de CXCR7 au niveau de la production d'ARNm et de protéines. Inversement, la suppression de la signalisation de l'IL-8 lui abolit la capacité à réguler à la hausse CXCR7 (340).

Dans mon travail de doctorat, j'ai étudié la régulation de l'expression de CXCR7 par l'estrogène. En utilisant différentes lignées cellulaires de différents tissus cancéreux (ER-positifs et ER-négatifs) nous avons montré que l'ARNm de CXCR7 est exprimé dans différentes lignées. Toutefois, sa régulation positive par les estrogènes est seulement observée dans la lignée cellulaire ovarienne cancéreuse OVCAR-3 et semble être ER α spécifique. En accord avec cette observation, le fait que CXCR7 soit réprimé par les estrogènes dans les cellules cancéreuses du sein (451), nous pouvons suggérer que nos résultats démontrent une sélectivité ovarienne dans la réponse estrogénique ciblant une régulation positive de l'axe CXCR7 et ce, comparativement aux autres lignées cellulaires que nous avons testé en parallèle.

La plupart des récepteurs des chimiokines n'ont pas de ligands exclusifs (508). C'est aussi le cas de CXCR7 qui partagent ses ligands SDF-1 et ITAC avec CXCR4 et CXCR3

respectivement. Par conséquent, il existe un haut degré de redondance dans la famille des chimiokines et c'est ce qui donne sa complexité au réseau des chimiokines et de leurs récepteurs. Nos résultats ont montré une augmentation sélective de l'expression des gènes CXCR7 et I-TAC dans les cellules cancéreuses de l'ovaire en réponse à l'estrogène tandis que l'expression de, et restée largement inchangée. Ces résultats suggèrent que la réponse estrogénique est spécifique à l'axe I-TAC/CXCR7.

1.2. Corrélation entre l'expression génique de CXCR7 et I-TAC avec ER α dans les tumeurs ovariennes humaines

Nous avons obtenu des résultats démontrant une sélectivité dans la réponse estrogénique quant à la régulation de l'expression du gène CXCR7. En effet, l'expression de CXCR7 semble être spécifique à l'isoforme, et l'ER α est l'acteur de cette régulation. L'analyse de données d'expression, dans les tumeurs ovariennes humaines, suggère une corrélation significative de l'expression du gène de ER α avec CXCR7 et non avec le gène CXCR3, confirmant donc une pertinence clinique en termes de régulation génique entre ER α et l'axe I-TAC/CXCR7 dans le cancer de l'ovaire, le distinguant de l'axe SDF-1/CXCR4 dans le même contexte. Le rôle favorable que joue CXCR7 dans la progression tumorale de plusieurs cancers, notamment le cancer de l'ovaire, ainsi que le rôle oncologique de ER α dans le cancer de l'ovaire, concordent avec nos résultats indiquant la régulation positive de CXCR7 par ER α . D'un autre côté, la corrélation négative que nous avons obtenue entre l'expression du gène de ER β et CXCR7 dans le même contexte clinique, est en accord avec les études ayant indiqué un rôle non-oncogénique de pour ER β dans le cancer de l'ovaire (417, 425, 428, 509). Étant donné que le rôle de ER β

dans le cancer de l’ovaire n’est pas encore certain, nos résultats peuvent apporter un nouvel élément permettant de distinguer les rôles transcriptionnels distincts des deux isoformes dans le cancer ovarien.

1.3. Identification d’un ERE fonctionnel dans le promoteur de CXCR7

Les récepteurs aux estrogènes sont des facteurs de transcription qui régulent un grand nombre de gènes cibles. Ces cibles sont particulièrement pertinentes dans les cancers où la sensibilité de la tumeur aux estrogènes détermine si les patients peuvent être traités avec une thérapie hormonale. L’identification des gènes cibles de ER est une tâche ardue. Quantifier les niveaux d’expression des gènes cibles suspectés après la stimulation avec E2, révèle quels gènes sont régulés par l’hormone, mais sans discrimination entre les cibles directes où ER lie les ERE et les cibles indirectes où ER se lie indirectement aux ERE via d’autres facteurs.

Avec le séquençage du génome humain, il est devenu possible de rechercher *in silico* la présence des éléments de réponses aux estrogènes (EREs). Pour déterminer si la régulation de l’expression du gène *CXCR7* par l’estrogène est directe ou indirecte, nous avons détecté des ERE spécifiques dans le promoteur *CXCR7* proximaux situés à 32562 pb, 42463 pb et 43192 pb et un ERE distal situé à 76380 pb dans le promoteur *CXCR7*. Nos résultats de ChIP indiquent que le complexe ER/ERE médie la régulation de l’expression de *CXCR7* par les estrogènes et suggèrent que ER α est impliqué dans la régulation de l’expression de *CXCR7* par liaison directe au site ERE-42463. Ce site est potentiellement actif sur le plan transcriptionnel tel que nous l’avons démontré par essai luciférase. De ce fait, nos résultats indiquent que le promoteur du gène *CXCR7* contient un ERE fonctionnel qui peut être critique pour induire une régulation

transcriptionnelle positive de CXCR7 par l'estrogène. Ainsi, nous avons identifié pour la première fois que le CXCR7 est un gène inductible par les œstrogènes via l'activation de ER α . Comme l'estrogène est important pour le développement du cancer de l'ovaire, l'identification de CXCR7 en tant que gène cible de l'estrogène fournira de nouvelles perspectives dans le traitement du cancer de l'ovaire.

1.4.CXCR7 peut promouvoir l'activité transcriptionnelle de ER α

Nous avons précédemment démontré que SDF-1 est induit dans les cellules cancéreuses du sein par l'estrogène, et que la phosphorylation de sérine-87 de l'isoforme ER β par SDF-1 potentialise l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes, générant une boucle de rétroaction positive entre les estrogènes et les chimiokines (117). Cet effet observé dans les cellules cancéreuses mammaires ne semble pas se produire dans les cellules cancéreuses ovariennes. En effet, nos résultats n'indiquent aucune régulation estrogénique de CXCR4 ou SDF-1 dans les cellules cancéreuses de l'ovaire. De plus, l'absence de corrélation entre ER β et CXCR7 ainsi que ER β et I-TAC dans les tumeurs ovariennes séreuses élevés, vient confirmer l'action limitée de ER β pour réguler CXCR7. Tout compte fait, les taux d'ER β sont particulièrement plus bas dans les tumeurs de l'ovaire que dans les tissus normaux (428, 435, 509, 510). De plus, la perte d'expression de ER β pourrait corrélérer avec une survie globale plus courte des patientes atteints du cancer de l'ovaire (511). D'autres études ont révélé que l'expression de ER β réduit la croissance tumorale et diminue la présence de cellules tumorales dans les métastases, suggérant un rôle potentiellement suppresseur de tumeur pour ER β dans la carcinogenèse ovarienne (210, 436). Pour déterminer si CXCR7 peut à son tour réguler l'activité

de ER α , nous avons effectué des essais de luciférase et nos résultats démontrent que CXCR7 a augmenté l'activité transcriptionnelle de ER α alors que le Knockdown de CXCR7 a significativement réduit l'activité du récepteur induite par E2 dans les cellules OVCAR-3. Ces résultats indiquent que CXCR7 peut promouvoir l'activité de ER α dans OVCAR-3. L'activité transcriptionnelle de ER α peut être induite par le ligand aussi bien que par phosphorylation. Dans les cellules cancéreuses mammaires, la phosphorylation de ER α favorise le recrutement des co-régulateurs transcriptionnels et joue ainsi, un rôle important dans la capacité transcriptionnelle du récepteur, et ce en présence ou en absence du ligand. La Ser-118 est un site majeur de phosphorylation pour activer ER α et la phosphorylation de ce résidu corrèle positivement avec la résistance à la thérapie du cancer du sein (452-454). Les résultats de mes travaux indiquent que dans les cellules cancéreuses ovariennes, la Ser-118 est également une cible de phosphorylation. Nous démontrons que la phosphorylation de la Ser-118 induite par l'estrogène est significativement perdue par le knockdown de CXCR7 et que pErk1/2 est impliqué dans la voie de signalisation de CXCR7. La phosphorylation de ER α dans le cancer de l'ovaire était inconnue et nous sommes les premiers à identifier CXCR7 comme indicateur de signalisation de la phosphorylation de ER α au niveau de la Ser-118.

1.5. Le rôle de CXCR7 dans la migration des cellules cancéreuses ovariennes

Dérivant de l'épithélium, la transition mésenchymateuse épithéliale (EMT) devient une étape critique pour le cancer de l'ovaire (512, 513). En effet, les analyses de l'immunohistochimie révèlent que l'EMT est associé à la métastase et à la survie des patientes

atteinte du cancer de l'ovaire (514, 515). Au niveau génétique, la surexpression des marqueurs de l'EMT tel que Snail, Twist et Zeb1/2, est associée à un mauvais pronostic du cancer de l'ovaire (516, 517) C'est pourquoi, l'expression des gènes dans les tumeurs métastatiques présentant généralement des signatures mésenchymateuses, confirment l'agressivité du cancer de l'ovaire (517, 518). La progression du cancer de l'ovaire est favorisée par les facteurs qui déclenchent l'EMT. Par ailleurs, les facteurs qui inhibent ou suppriment l'EMT, empêchent la progression du cancer de l'ovaire. Par exemple, la mucine 4 qui induit l'EMT dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, favorise fortement la progression du cancer et elle est souvent surexprimée dans les tumeurs ovariennes de haut grade (519), tandis que MicroRNA-200c qui altère l'EMT, inhibe la métastase des cellules souches CD117 + CD44 + du cancer de l'ovaire (520). Les facteurs de croissance tel que EGF, FGF, IGF, VEGF, TGF- β (500) sont aussi des signaux induisant les EMT dans la progression du cancer. L'hypoxie (521, 522), l'inflammation (523, 524) et le stress oxydatif (525) sont des microenvironnements inducteurs de l'EMT, car ils déclenchent des signaux convergeant vers les facteurs transcriptionnels induisant l'EMT. Dans le microenvironnement tumoral, les chimiokines jouent un rôle essentiel dans la tumorigenèse et la métastase. Dans le cancer du poumon, une étude indique que TGF β 1 régule à la hausse l'EMT et CXCR7 et que le knockdown de CXCR7 abouti à la réduction de la migration, l'invasion et l'EMT induite par TGF β 1 in vivo (526). Il y a de plus en plus de preuves que CXCR7 est impliqué dans la migration des cellules cancéreuses (294). Il a été montré que CXCR7 pourrait induire une migration cellulaire par SDF-1 dans le cancer colorectal (527). Dans le cancer de l'ovaire, les résultats d'une étude récente indiquent que CXCR7 améliore l'invasion des cellules cancéreuses de l'ovaire par l'expression de la MMP-9 via la voie p38 MAPK (351). Par le biais de mes travaux, nous avons démontré que CXCR7 joue un rôle

important dans la migration induite par l'E2 des cellules cancéreuses de l'ovaire de type OVCAR-3 ER-positives. En effet, le knockdown *CXCR7* a significativement atténué la migration des cellules OVCAR-3 induite par E2. Des études antérieures ont rapporté la pertinence entre l'expression de *CXCR7* et les molécules qui étaient importantes dans l'adhésion cellulaire et l'interaction cellule-matrice (321, 338, 351, 526, 528-530). Ces données ont montré une diminution significative des métalloprotéinases matricielles (MMP-2 et MMP-9) (351, 530) et des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire (cadhérine-11 (321), N-cadhérine (526, 528)) après knockdown *CXCR7*, suggérant que ces molécules peuvent jouer un rôle dans la migration médié par *CXCR7* et l'invasion des cellules cancéreuses. Nos données ont montré que, dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, le knockdown de *CXCR7* altère l'EMT induite par l'E2 en régulant à la baisse l'expression de Snail et de la N-cadhérine, et régule positivement l'expression de la E-cadhérine. Ici, nous démontrons la contribution de *CXCR7* dans la régulation des marqueurs EMT par E2. Nous pensons que la migration induite par E2 et altérée par le knockdown de *CXCR7* peut être liée à la phosphorylation de ER α -Ser-118 (pS118). Effectivement, nos résultats ont montré que knockdown de *CXCR7* diminue la pS118 dans OVCAR-3. Il existe des preuves que même en l'absence d'estrogène, ER α continue à réguler la transcription par son domaine d'activation AF-1, et ce par la phosphorylation de ER α sur plusieurs sites, notamment la serine-118 (S118) et la sérine-167 (531) et que cette phosphorylation peut être induite par E2 ou MAPK (153, 157). Grâce aux études précédentes, il a été démontré que la phosphorylation de S118 est associée à une meilleure réponse au traitement cancer du sein par le tamoxifène (532, 533). Notre observation que le knockdown de *CXCR7* a modifié l'activité transcriptionnelle ER α qui peut nécessiter l'activation de Erk pour

phosphoryler S118, correspond au fait que la phosphorylation de la Ser-118 est un marqueur prédictif pour la réponse au tamoxifène (531).

2. Identification d'un mécanisme par lequel ER β est activé par Pin1

2.1. Interaction entre Pin1 et ER β

Pin1 est la seule prolyl isomérase connue ayant la propriété unique de catalyser l'isomérisation cis/trans de la liaison peptidique entre la sérine ou la thréonine phosphorylée et la proline (pSer/Thr-Pro). Cette isomérisation fonctionne comme un minuteur moléculaire qui module de nombreuses cibles, et ce à différentes étapes d'un processus cellulaire et sa dérégulation contribue à de nombreux cancers (488). Mes travaux ont identifié Pin1 en tant que cofacteur de recrutement de ER β . Ce cofacteur a pour effet d'augmenter la réponse estrogénique de ce récepteur dans les cellules cancéreuses du sein. Pin1 est connue pour réguler les fonctions des protéines, en liant le motif pSer / Thr-Pro dans les substrats via son domaine WW. Nous avons d'ailleurs réalisé ce travail pour mieux comprendre l'impact de Pin1 sur ER β dans le cancer du sein. Nous avons identifié que la peptidyl prolyl isomérase Pin 1 augmente l'activité de ER β induite par E2 dans les cellules cancéreuses du sein. Nous avons trouvé que Pin1 se lie à ER β et que le domaine WW de Pin1 est essentiel pour cette interaction. En effet, La mutation des résidus clés dans le domaine WW altère la capacité de Pin1 à améliorer l'activité ER β . La phosphorylation des motifs Ser/Thr-Pro par les kinases est un mécanisme de signalisation commun et central, dont les enzymes responsables de la phosphorylation appartiennent à une

grande superfamille de protéines kinases dirigées contre la proline comprennent CDK, MAPK, ERK, p38, GSK3 et PLK (361). La phosphorylation de ER β par diverses kinases telles que MAPK/Erk, Jnk, p38 et PKB/Akt joue un rôle important dans la régulation des fonctions du récepteur (40). L'interaction entre Pin1 et ER β augmentée par l'estrogène peut être expliquée par le couplage estrogène-chimiokine, phénomène démontré dans une publication antérieure de notre groupe. En effet, l'activation de ER β par l'estrogène conduit à la transcription de SDF-1 qui va lier CXCR4 à la surface pour activer la voie MAPK/Erk menant à la phosphorylation de la sérine-87 de ER β (117). Phosphorylée et étant dans le motif Ser-Pro, la sérine-87 devient une cible potentielle pour l'interaction de Pin1 expliquant l'augmentation de l'interaction de Pin1 avec ER β en réponse à l'estrogène.

2.2. Régulation de l'activité transcriptionnelle de ER β par Pin1

L'activation de ER β par l'estrogène ou par phosphorylation médie la transcription de divers gènes. Pin1 se lie à la liaison peptidyl-prolyle et l'isomérisé en motifs Ser/Thr-Pro phosphorylés spécifiques, pour induire des changements conformationnels dans ses protéines cibles. Ces changements conformationnels peuvent avoir des effets profonds sur la fonction du substrat de Pin1, en modulant son activité, son état de phosphorylation, l'interaction protéine-protéine, sa localisation subcellulaire et sa stabilité. Mes travaux présentent un rôle pour Pin1 dans l'amélioration de l'activité transcriptionnelle de ER β grâce à l'activité propyl isomérase de Pin1. Ce dernier interagit directement avec ER β phosphorylé et augmente sa stabilité en induisant un changement conformationnel de ce facteur de transcription. Il est intéressant de noter que dans le cancer du sein, Pin1 induit une modification conformationnelle de ER α et

augmente son activité transcriptionnelle tout en augmentant sa stabilité par l'inhibition de son ubiquitination et sa dégradation (404). Dans le cancer de la prostate, Pin1 interagit avec le récepteur nucléaire AR (Androgen receptor) par le biais de la sérine-81 et augmente son activité transcriptionnelle (398). TR3, un facteur de transcription nucléaire orphelin, dont les fonctions biologiques sont opposées dans différents types cellulaires, mais qui joue un rôle positif dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses, interagit avec Pin1. L'isomérisation de TR3 par Pin1 via la sérine-95 conduit à la transactivation du récepteur et améliore sa stabilité en retardant sa dégradation. En outre, Pin1 facilite le ciblage de TR3 au promoteur de son gène cible, la cycline D2, et favorise également le recrutement de p300 (399). Par ailleurs, l'activité transcriptionnelle de la famille des récepteurs nucléaires orphelins NR4A incluant (Nur77, Nurr1 et NOR-1) est aussi améliorée par Pin1. Les facteurs de transcription NR4A jouent un rôle dans la régulation du métabolisme dans le foie, les muscles squelettiques et les tissus adipeux et dans les processus cellulaires de base tels que la différenciation, l'apoptose, la prolifération et les réponses au stress, sont modulés par les récepteurs nucléaires NR4A (534-538). Pin1 améliore l'activité transcriptionnelle des trois récepteurs nucléaires NR4A et augmente la stabilité protéique de Nur77 en inhibant son ubiquitination (400). En ce qui concerne ER β , mes résultats indiquent que Pin1 agit comme cofacteur transcriptionnel qui augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur, induite par l'estrogène. Fait intéressant, Pin1 a conféré une plus grande régulation des gènes dans la réponse estrogénique, soutenant le rôle positif de Pin1 sur l'activité ER β et supportant un rôle fonctionnel de Pin1 dans la régulation à la hausse de l'activité transcriptionnelle ER β . Cette activité transcriptionnelle se traduit par l'expression des gènes hormono-sensibles qui sont ciblé par ER β . De plus, Pin1 augmente l'activité de ER β via ER β -pSer87 et cette régulation dépend des domaines WW et PPIase de

Pin1 tel qu'indiqué par nos résultats. Après la phosphorylation des motifs Ser/Thr-Pro par des kinases dirigées contre la proline, Pin1 agit comme régulateur de post-phosphorylation en modifiant la conformation de ses protéines cibles (15). La mutation de la Ser-87 en alanine a complètement aboli l'activité transcriptionnelle accrue induite par Pin1. Cela soulève la question de savoir comment Pin1 favorise l'activité de ER β à cette sérine. La Ser-87 est situé dans le domaine AF-1, une région qui s'avère importante pour la stabilité de ER β (40). Après la phosphorylation de AF-1, des coactivateurs tels que SRC-1 et CBP sont recrutés, conduisant à l'activation de ER β (38, 39). L'activité Cis-trans isomérase de Pin1 est essentielle pour la stabilité médiée par Pin1 et l'activation de ER β , c'est pourquoi nous pensons que la liaison de Pin1 à la Ser-87 pourrait induire l'isomérisation cis-trans de ER β . Pris ensemble, nos résultats suggèrent que ER β -Ser87, le site potentiel de phosphorylation ERK, est ciblé par Pin1 et que ce site est important pour que l'interaction et la régulation de ER β .

2.3.Implication de Pin1 dans la migration des cellules cancéreuses mammaires induite par E2

Dans cette étude, nous avons démontré que l'isomérisation induite de ER β par Pin1 modifie les propriétés de ER β . En effet, nous avons observé que le potentiel de migration dans les cellules cancéreuses du sein HS-578T-ER β est activé par Pin1 en réponse à E2. Pin1 n'a pas réussi à induire le même effet lorsque la Ser-87 est mutée en alanine dans des cellules HS-578T-ER3-S87A. La migration des cellules cancéreuses conduit à un mécanisme de métastase qui est assuré par le détachement des cellules de leur tissu d'origine et la migration vers un autre organe par le mécanisme d'EMT (499, 500). La E-cadhérine, la principale molécule d'adhésion cellule-

cellule épithéliale, est régulée à la baisse dans le cancer du sein et utilisée comme marqueur tumoral (501). La E-cadhérine est réprimée par les facteurs transcriptionnels Snail et Slug qui appartiennent également aux voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'EMT (502, 503). Nos données ont montré que la migration induite par E2 dans les cellules HS-578T favorisées par ER β n'est pas significative. Cependant, la surexpression de Pin1 dans HS-578T-ER β a amélioré la migration des cellules en réponse à E2. Une étude avait indiqué que'en réponse à l'estrogène, ER β régule directement la voie EMT pour augmenter la migration cellulaire en supprimant la E-cadhérine et induisant la vimentine (504). Inversement, dans une autre étude, ER β semble avoir un effet négatif sur l'EMT supportant la suppression tumorale et le rôle anti-métastatique dans le cancer du sein (539). Ici, nous avons obtenu une augmentation significative de la migration cellulaire en réponse à E2 dans HS-578T-ER β en présence de Pin1 ainsi que la régulation positive des marqueurs EMT induite par Pin1. Nos résultats suggèrent clairement que Pin1 change les propriétés de ER β , de l'inhibiteur de la migration à l'activateur. L'isomérisation induite par Pin1 pourrait modifier la conformation de ER β favorisant l'exposition de son domaine AF-1, en particulier la Ser-87 puisque cette sérine est importante pour l'activité transcriptionnelle de ER β . D'autant plus que nous avons identifié l'implication de cette sérine dans l'agressivité des cellules cancéreuses du sein en démontrant le couplage de la voie estrogène-chimiokine (117). Nos résultats peuvent expliquer en partie la résistance développée dans le cancer du sein ER β positif où le rôle de ER β reste incertain.

Perspectives

Étudier le potentiel de CXCR7 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique dans le cancer de l’ovaire

Dans le premier volet de cette étude, nous démontrons que dans les cellules cancéreuses ovariennes ER+, l'estrogène augmente l'expression de CXCR7 et I-TAC et que CXCR7 augmente la transition EMT des cellules cancéreuses ovariennes induite par E2 à travers la phosphorylation de la sérine-118 de ER α . Les facteurs de risque du cancer de l'ovaire ne sont pas encore bien établis. Cependant, les chercheurs ont découvert les effets de plusieurs facteurs hormonaux spécifiques, y compris la gonadotrophine, l'androgène, la progestérone et les estrogènes sur le développement du cancer de l'ovaire (540). Dans le cas de l'estrogène, par un certain nombre de preuves cliniques, il a été constaté que E2 en thérapie de remplacement des estrogènes augmentait le risque de cancer de l'ovaire (541-543). À l'heure actuelle, le traitement standard du cancer de l'ovaire est basé sur la chirurgie de réduction tumorale primaire suivie de chimiothérapie (544). Bien que la majorité des patientes atteintes du cancer de l'ovaire répondent à la chimiothérapie initiale, la plupart d'entre elles développent une résistance et leur traitement rechute. Les antiestrogènes, le tamoxifène et le fulvestrant, sont utilisés dans l'hormonothérapie mais sans réaliser un succès complet. Dans le cancer du sein, la sérine-118 de ER α corrèle avec la résistance au tamoxifène (545). De ce fait, l'identification de CXCR7 comme étant activateur de ER α par phosphorylation de la sérine-118 pourrait soulever la pertinence d'utiliser CXCR7 comme biomarqueurs pour les tumeurs ovariennes ER α -positives. Ceci concorde avec les résultats de la corrélation clinique significative de l'expression de ER α avec CXCR7 dans les

tumeurs ovariennes que nous avons présentés dans ce travail. Il y a très peu de littératures sur l'implication de CXCR7 dans le cancer de l'ovaire. Toutefois, dans le glioblastome, le cancer de la vessie (547) et les tissus cancéreux gastriques (548), CXCR7 est identifié comme un potentiel biomarqueur pronostique. Étant donné que CXCR7 est impliqué dans la régulation de ER α et l'amélioration de EMT induite par E2, considérer CXCR7 comme biomarqueurs du cancer de l'ovaire au stade précoce pourrait améliorer significativement les statistiques de survie qui sont sombre pour le cancer de l'ovaire. En effet, 95% des patientes atteintes diagnostiquées au stade I présentant un taux de survie de 5 ans contre 35% des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire diagnostiquées au stade III, et ce taux tombe 10% chez les patients diagnostiqués avec un cancer de l'ovaire de stade IV, où la maladie s'est propagée à des métastases(549).

ER β peut-il influencer le couplage entre CXCR7 et ER α ?

L'expression plus faible de ER β ainsi que les effets antagonistes que peuvent avoir ER α et ER β l'un par rapport à l'autre, font que le ratio ER α /ER β soit plus élevé dans les tissus cancéreux ovariens que dans les tissus sains. De ce fait, dans un contexte de surexpression, ER β semble réduire la prolifération cellulaire induite par l'activation de ER α (550). Dans le cancer de l'ovaire, plusieurs groupes ont rapporté la perte de l'expression de ER β ou une augmentation du ratio ER α /ER β comparativement aux tissus normaux (417, 425, 428, 509) suggérant que la perte de ER β pourrait constituer une étape cruciale dans la carcinogenèse ovarienne. Par ailleurs, des études ont indiqué que la perte complète de l'expression de ER β a également été associée à un risque accru de métastase dans le cancer de l'ovaire pithélial (551, 552). Effectivement, une preuve indirecte que ER β soit liée à la carcinogenèse ovarienne, est que son expression est

significativement corrélée avec la survie dans les modèles humains et animaux (210, 553). Nos résultats démontrent qu'à l'inverse de la corrélation positive entre l'expression génique de ER α et de CXCR7, l'expression génique de ER β corréle négativement avec l'expression de CXCR7. De ce fait, il pourrait être pertinent de considérer la perspective d'investiguer le rôle potentiellement suppresseur tumoral de ER β sur le couplage entre ER α et CXCR7. Dans cette perspective, il serait intéressant de faire moduler le ratio ER α /ER β dans les cellules OVCAR-3 en déplaçant ou en surexprimant ER β . La mesure de l'activation de ERK1/2, la phosphorylation de la serine-118 de ER α , l'expression des gènes cibles dont I-TAC et la migration des cellules en réponse à l'estrogène nous permettrait d'évaluer l'impact de ER β sur la signalisation de CXCR7 et le couplage entre ER α et CXCR7.

L'implication de Pin1 dans la résistance au tamoxifène

Nous avons démontré que Pin1 augmente l'activité transcriptionnelle de ER β par ainsi que la migration cellulaire induite par l'estrogène, suggérant que Pin1 joue un rôle dans la carcinogénèse mammaire médiée par ER β . Ceci concorde avec les résultats que nous avons publiés où la phosphorylation de la Ser-87 de ER β est impliquée dans le couplage entre les ERs et CXCR4 rendant le cancer du sein plus agressif. À la lumière de toutes ces données, il devient logique d'inférer l'implication de ER β dans la résistance aux traitements qui cible ER α . En effet, l'amplification de l'activité de ER β pourrait compenser l'ablation ER α par les traitements. C'est pourquoi il serait intéressant d'identifier le rôle de Pin1 dans la résistance aux traitements dans le contexte de ER β . Dans cette perspective, il faut envisager d'évaluer si l'interaction entre Pin1 et ER β par co-immunoprécipitation ou par GST, est favorisée par le tamoxifène. Étant donné

que la résistance au tamoxifène résulte de l'augmentation de la fonction du domaine AF-1, et que la sérine-87 se trouve dans cette région, l'évaluation de l'implication de ce résidu dans l'interaction, probablement induite par le tamoxifène, entre Pin1 et ER β , serait aussi à envisager. Il serait par la suite pertinent d'évaluer si Pin1 peut augmenter l'activité de ER β en présence du tamoxifène. Dans la même optique, l'utilisation d'un model cellulaire résistant au tamoxifène, tel que MCF-75C, pour évaluer l'effet du knockdown de Pin1 sur la prolifération ou la migration cellulaire, constituerait une bonne façon de confirmer que le knockdown de Pin1 sur la résistance au tamoxifène, et indiquer si Pin1 favorise la résistance au tamoxifène dans les cellules cancéreuses du sein par le biais de ER β .

Implication de la sérine-87 dans la pathogénicité du cancer du sein

Nous avons démontré que la sérine-87 de ER β est une cible pour Pin1. Nous avons aussi démontré que la sérine-87 est importante pour la stabilité du récepteur augmentée par Pin1 et que la phosphorylation de cette sérine est cruciale pour l'action de Pin1 sur ER β , et qu'elle est essentielle dans l'activité transcriptionnelle de ER β ainsi que dans la migration cellulaire induite par l'estrogène. Beaucoup d'études se sont focalisées sur la régulation des gènes par ER α et ER β en réponse à l'estrogène, mais aucune étude à grande échelle ne s'est penchée sur l'implication des sites de phosphorylation des ERs dans la régulation des gènes. Nous démontrons ici, par essai luciférase, que la mutation de la sérine-87 en alanine altère l'activité transcriptionnelle de ER β . De ce fait, il serait intéressant de déterminer l'impact de la sérine-87 sur la régulation des gènes en réponse à l'estrogène en présence et en absence de Pin1. Pour ce faire, l'utilisation de microarray s'avère une excellente méthode fournissant un profil des gènes

régulés selon leurs fonctions. L'importance de la caractérisation des rôles des sites de phosphorylation tel que la sérine-87 de ER β pourrait s'inscrire dans la perspective de développement d'anticorps monoclonaux spécifiques pouvant devenir une alternative aux thérapies chimiques (233).

Conclusion

La signalisation des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β est impliquée dans plusieurs aspects physiologiques et pathogéniques des tissus sensibles aux estrogènes (ovaires, utérus, seins). Dans le cancer de l’ovaire, nous avons montré que CXCR7 joue un rôle important dans la migration cellulaire et la prolifération du cancer ovarien ER-positif. Nous avons constaté que les estrogènes pourraient favoriser le développement du cancer de l’ovaire en activant un ERE dans le promoteur de CXCR7. L’altération de CXCR7 a diminué la migration cellulaire induite par l’E2 affectant l’expression des facteurs liés à l’EMT. De plus, CXCR7 peut réguler l’activité transcriptionnelle ER α en phosphorylant la Ser-118. À la lumière de ces résultats, nous pensons que CXCR7 pourrait être une cible potentielle pour le traitement du cancer ovarien. D’un autre côté, dans le cancer du sein, notre étude a exploré l’effet fonctionnel possible de l’interaction entre Pin1 et ER β . Nous avons montré que l’isomérisation ER β par Pin1 par l’intermédiaire de la Ser-87 joue un rôle important dans la migration cellulaire du cancer du sein, suggérant que la régulation de l’interaction entre Pin1 et ER β pourrait également être une cible potentielle pour la prévention du cancer du sein. Par conséquent, l’identification de Pin1 comme un nouveau régulateur de ER β fournit de nouveaux aperçus sur la fonction d’inducteur de tumeur pour l’isoforme ER β .

Bibliographie

1. Birkhauser M. [Treatment of pain in estrogen deficiency]. Archives of gynecology and obstetrics. 1996;259 Suppl 1:S74-9.
2. Inoue T, Miki Y, Abe K, Hatori M, Hosaka M, Kariya Y, et al. Sex steroid synthesis in human skin in situ: the roles of aromatase and steroidogenic acute regulatory protein in the homeostasis of human skin. Molecular and cellular endocrinology. 2012;362(1-2):19-28.
3. Ashcroft GS, Ashworth JJ. Potential role of estrogens in wound healing. Am J Clin Dermatol. 2003;4(11):737-43.
4. Alvarez A, Hermenegildo C, Issekutz AC, Esplugues JV, Sanz MJ. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation. Circulation research. 2002;91(12):1142-50.
5. Rodriguez E, Lopez R, Paez A, Masso F, Montano LF. 17Beta-estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF-alpha stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription. Life Sci. 2002;71(18):2181-93.
6. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends in molecular medicine. 2013;19(3):197-209.
7. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. Molecular and cellular endocrinology. 1994;100(1-2):51-4.
8. Ghayee HK, Auchus RJ. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2007;8(4):289-300.
9. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol. 1998;9(4):411-6.
10. Pelletier G. Chapter 11 - Steroidogenic Enzymes in the Brain: Morphological Aspects. In: Martini L, editor. Progress in Brain Research. 181: Elsevier; 2010. p. 193-207.
11. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, et al. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. Journal of molecular endocrinology. 2000;25(1):1-16.
12. Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: saga of an important biological mediator and therapeutic target. Endocrine reviews. 2009;30(4):343-75.
13. Carreau S, de Vienne C, Galeraud-Denis I. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. Adv Med Sci. 2008;53(2):139-44.
14. Porter JC. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. The Journal of investigative dermatology. 1974;63(1):85-92.
15. Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2000;85(5):2057-67.
16. Mahony S, Auron P, Benos P. DNA familial binding profiles made easy: comparison of various motif alignment and clustering strategies. PLoS Comput Biol. 2007;3:e61.
17. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation. 2006;113(13):1708-14.
18. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. Fed Proc. 1979;38(1):66-71.

19. Frank JS, Fogelman AM. Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing and freeze-etching. *J Lipid Res.* 1989;30(7):967-78.
20. Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *The American journal of pathology.* 1986;123(1):109-25.
21. Walsh BW. The effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators on cardiovascular risk factors. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;949:163-7.
22. Lufkin T, Mark M, Hart CP, Dolle P, LeMeur M, Chambon P. Homeotic transformation of the occipital bones of the skull by ectopic expression of a homeobox gene. *Nature.* 1992;359(6398):835-41.
23. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(12):6871-6.
24. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(12):6871-6.
25. Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Journal of neurobiology.* 1999;40(4):574-84.
26. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli L, et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nature medicine.* 1998;4(4):447-51.
27. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study. JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2000;283(8):1007-15.
28. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116(3):561-70.
29. Jensen EV, Jacobson HI, Walf AA, Frye CA. Estrogen action: a historic perspective on the implications of considering alternative approaches. *Physiology & behavior.* 2010;99(2):151-62.
30. Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2003;9(6):1980-9.
31. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics.* 1997;45(3):607-17.
32. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md).* 2002;16(1):70-84.
33. Filardo EJ, Thomas P. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2005;16(8):362-7.
34. Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2002;3(3):193-200.

35. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiological reviews*. 2001;81(4):1535-65.
36. Albanito L, Lappano R, Madeo A, Chimento A, Prossnitz ER, Cappello AR, et al. G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environmental health perspectives*. 2008;116(12):1648-55.
37. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual review of physiology*. 2008;70:165-90.
38. Aranda A PA. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological reviews*. 2001;81:1269-304.
39. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*. 1996;392(1):49-53.
40. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(2):104-10.
41. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(1):1-10.
42. Lavery Derek N, McEwan Iain J. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochemical Journal*. 2005;391(Pt 3):449-64.
43. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(10):1901-9.
44. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999;64(5):310-9.
45. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1987;51(6):941-51.
46. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neeffjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 8):1253-61.
47. Berry NB, Fan M, Nephew KP. Estrogen Receptor- α Hinge-Region Lysines 302 and 303 Regulate Receptor Degradation by the Proteasome. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22(7):1535-51.
48. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan M-C, Corbo L. Sumoylation of the Estrogen Receptor α Hinge Region Regulates Its Transcriptional Activity. *Molecular Endocrinology*. 2005;19(11):2671-84.
49. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(7):4830-40.
50. Staub O, Rotin D. Role of ubiquitylation in cellular membrane transport. *Physiological reviews*. 2006;86(2):669-707.
51. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Molecular cell*. 2005;18(1):1-12.

52. Llopis J, Westin S, Ricote M, Wang J, Cho CY, Kurokawa R, et al. Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(8):4363-8.
53. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389(6652):753-8.
54. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences*. 2000;21(10):381-8.
55. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology*. 1996;3(1):87-94.
56. Fliss AE, Benzeno S, Rao J, Caplan AJ. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;72(5):223-30.
57. Skafar DF, Zhao C. The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine*. 2008;33(1):1-8.
58. Warnmark A, Almlöf T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E. Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(26):23397-404.
59. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1998;280(7):605-13.
60. Chen M, Wolfe A, Wang X, Chang C, Yeh S, Radovick S. Generation and characterization of a complete null estrogen receptor alpha mouse using Cre/LoxP technology. *Molecular and cellular biochemistry*. 2009;321(1-2):145-53.
61. Jayachandran M, Preston CC, Hunter LW, Jahangir A, Owen WG, Korach KS, et al. Loss of estrogen receptor beta decreases mitochondrial energetic potential and increases thrombogenicity of platelets in aged female mice. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2010;32(1):109-21.
62. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2004;50(1):3-22.
63. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;74(5):287-96.
64. Bockamp E, Sprengel R, Eshkind L, Lehmann T, Braun JM, Emmrich F, et al. Conditional transgenic mouse models: from the basics to genome-wide sets of knockouts and current studies of tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 2008;3(2):217-35.
65. Sun J, Langer WJ, Devish K, Lane PH. Compensatory kidney growth in estrogen receptor-alpha null mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;290(2):F319-23.
66. Drummond AE, Fuller PJ. The importance of ERbeta signalling in the ovary. *The Journal of endocrinology*. 2010;205(1):15-23.

67. Chen M, Hsu I, Wolfe A, Radovick S, Huang K, Yu S, et al. Defects of prostate development and reproductive system in the estrogen receptor-alpha null male mice. *Endocrinology*. 2009;150(1):251-9.
68. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science (New York, NY)*. 1999;286(5448):2328-31.
69. Chilibeck PD, Cornish SM. Effect of estrogenic compounds (estrogen or phytoestrogens) combined with exercise on bone and muscle mass in older individuals. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2008;33(1):200-12.
70. Syed FA, Fraser DG, Spelsberg TC, Rosen CJ, Krust A, Chambon P, et al. Effects of loss of classical estrogen response element signaling on bone in male mice. *Endocrinology*. 2007;148(4):1902-10.
71. Imai Y, Kondoh S, Kouzmenko A, Kato S. Regulation of bone metabolism by nuclear receptors. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;310(1-2):3-10.
72. Li BY, Tong J, Zhang ZL. [Exogenous estrogen improved calcium homeostasis and skeletal mineralization in vitamin D receptor gene knockout female mice]. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*. 2006;58(6):573-6.
73. Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2008;19(11):1517-25.
74. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993;75(1):73-82.
75. Mohan S, Jennings JC, Linkhart TA, Baylink DJ. Primary structure of human skeletal growth factor: homology with human insulin-like growth factor-II. *Biochim Biophys Acta*. 1988;966(1):44-55.
76. Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, et al. Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nature medicine*. 2012;18(7):1095-101.
77. Vico L, Vanacker JM. Sex hormones and their receptors in bone homeostasis: insights from genetically modified mouse models. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(3):365-72.
78. Lindsay R, Gallagher JC, Kagan R, Pickar JH, Constantine G. Efficacy of tissue-selective estrogen complex of bazedoxifene/conjugated estrogens for osteoporosis prevention in at-risk postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2009;92(3):1045-52.
79. Love RR, Barden HS, Mazess RB, Epstein S, Chappell RJ. Effect of tamoxifen on lumbar spine bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Arch Intern Med*. 1994;154(22):2585-8.
80. Malozowski S. Lasofoxifene for postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*. 2010;362(23):2227; author reply 8-9.
81. McClung MR, Siris E, Cummings S, Bolognese M, Ettinger M, Moffett A, et al. Prevention of bone loss in postmenopausal women treated with lasofoxifene compared with raloxifene. *Menopause*. 2006;13(3):377-86.

82. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular aspects of medicine*. 2006;27(4):299-402.
83. Faustini-Fustini M, Rochira V, Carani C. Oestrogen deficiency in men: where are we today? *Eur J Endocrinol*. 1999;140(2):111-29.
84. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(12):3689-98.
85. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *The New England journal of medicine*. 1994;331(16):1056-61.
86. Luksha L, Kublickiene K. The role of estrogen receptor subtypes for vascular maintenance. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2009;25(2):82-95.
87. Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science (New York, NY)*. 2002;295(5554):505-8.
88. Kim KH, Moriarty K, Bender JR. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptors. *Steroids*. 2008;73(9-10):864-9.
89. Swedenborg E, Power KA, Cai W, Pongratz I, Ruegg J. Regulation of estrogen receptor beta activity and implications in health and disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(24):3873-94.
90. Campos H, Genest JJ, Jr., Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, et al. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*. 1992;12(2):187-95.
91. Coresh J, Kwiterovich PO, Jr., Smith HH, Bachorik PS. Association of plasma triglyceride concentration and LDL particle diameter, density, and chemical composition with premature coronary artery disease in men and women. *J Lipid Res*. 1993;34(10):1687-97.
92. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J, Blanche PJ, Holl LG, Sacks FM, et al. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1996;276(11):882-8.
93. Campos H, Walsh BW, Judge H, Sacks FM. Effect of Estrogen on Very Low Density Lipoprotein and Low Density Lipoprotein Subclass Metabolism in Postmenopausal Women1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997;82(12):3955-63.
94. Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *The New England journal of medicine*. 1991;325(17):1196-204.
95. McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, et al. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(13):7093-100.
96. Kalita K, Szymczak S. [Estrogen receptors in the brain]. *Neurologia i neurochirurgia polska*. 2003;37 Suppl 3:63-78.
97. Crews D, Fuller T, Mirasol EG, Pfaff DW, Ogawa S. Postnatal environment affects behavior of adult transgenic mice. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2004;229(9):935-9.

98. Moggs JG, Tinwell H, Spurway T, Chang H-S, Pate I, Lim FL, et al. Phenotypic Anchoring of Gene Expression Changes during Estrogen-Induced Uterine Growth. *Environmental health perspectives*. 2004;112(16):1589-606.
99. Hill RA, Boon WC. Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models. *Seminars in reproductive medicine*. 2009;27(3):218-28.
100. Hughes ZA, Liu F, Marquis K, Muniz L, Pangalos MN, Ring RH, et al. Estrogen receptor neurobiology and its potential for translation into broad spectrum therapeutics for CNS disorders. *Current molecular pharmacology*. 2009;2(3):215-36.
101. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2792-6.
102. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(2):703-8.
103. Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):12278-82.
104. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(32):19858-62.
105. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1997;11(10):1486-96.
106. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Molecular cell*. 1999;3(4):513-9.
107. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006;20(3):534-43.
108. Grober O, Mutarelli M, Giurato G, Ravo M, Cicatiello L, De Filippo M, et al. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics*. 2011;12(1):36.
109. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Molecular interventions*. 2003;3(5):281-92.
110. Park M-A, Hwang K-A, Choi K-C. Diverse animal models to examine potential role(s) and mechanism of endocrine disrupting chemicals on the tumor progression and prevention: Do they have tumorigenic or anti-tumorigenic property? *Laboratory Animal Research*. 2011;27(4):265-73.
111. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(14):2905-19.
112. Lodish H BA, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, et al. *Molecular cell biology*. 6th ed. . New York: WH Freeman and Company. 2008.
113. Cicatiello L, Addeo R, Sasso A, Altucci L, Petrizzi VB, Borgo R, et al. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a

- distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(16):7260-74.
114. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000;74(5):311-7.
115. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(4):833-42.
116. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular and cellular biology*. 1999;19(2):1002-15.
117. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer research*. 2009;69(14):5793-800.
118. Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, et al. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12626-30.
119. Sporn MB, Roberts AB. Peptide growth factors and inflammation, tissue repair, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;78(2):329-32.
120. Gori I, Pellegrini C, Staedler D, Russell R, Jan C, Canny GO. Tumor necrosis factor-alpha activates estrogen signaling pathways in endometrial epithelial cells via estrogen receptor alpha. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;345(1-2):27-37.
121. Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5038):1636-9.
122. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1213-26.
123. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-17.
124. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(8):627-44.
125. Manni S, Mauban JH, Ward CW, Bond M. Phosphorylation of the cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) Regulatory Subunit Modulates PKA-AKAP Interaction, Substrate Phosphorylation, and Calcium Signaling in Cardiac Cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(35):24145-54.
126. Zaccolo AKM. Activation of PKA in cell requires higher concentration of cAMP than in vitro: implications for compartmentalization of cAMP signalling. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 14090. 22 May 2017.
127. Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL. Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(27):16548-55.
128. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology*. 2012;153(7):2953-62.

129. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5715):1625-30.
130. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine reviews*. 2011;32(5):597-622.
131. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):321-44.
132. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology*. 2004;66:315-60.
133. Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):403-10.
134. Hall J, Couse J, Korach K. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:36869 - 72.
135. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):542-54.
136. Xu J, O'Malley BW. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2002;3(3):185-92.
137. Kershah SM, Desouki MM, Koterba KL, Rowan BG. Expression of estrogen receptor coregulators in normal and malignant human endometrium. *Gynecologic oncology*. 2004;92(1):304-13.
138. Karmakar S, Foster EA, Blackmore JK, Smith CL. Distinctive functions of p160 steroid receptor coactivators in proliferation of an estrogen-independent, tamoxifen-resistant breast cancer cell line. *Endocrine-related cancer*. 2011;18(1):113-27.
139. Shao W, Rosenauer A, Mann K, Chang C-PB, Rachez C, Freedman LP, et al. Ligand-inducible interaction of the DRIP/TRAP coactivator complex with retinoid receptors in retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. 2000;96(6):2233-9.
140. Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S, Oesterreich S. Estrogen receptor corepressors - a role in human breast cancer? *Endocrine-related cancer*. 2003;10(4):517-36.
141. Hong W, Chen L, Li J, Yao Z. Inhibition of MAP kinase promotes the recruitment of corepressor SMRT by tamoxifen-bound estrogen receptor alpha and potentiates tamoxifen action in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;396(2):299-303.
142. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *Journal of molecular endocrinology*. 2004;33(2):387-410.
143. La Rosa P, Acconcia F. Signaling functions of ubiquitin in the 17 β -estradiol (E2):estrogen receptor (ER) α network. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(3):223-30.
144. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(14):2709-21.
145. Faus H, Haendler B. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(9):520-8.

146. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(21):18375-83.
147. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, et al. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Molecular cell*. 2008;30(3):336-47.
148. Poulard C, Rambaud J, Hussein N, Corbo L, Le Romancer M. JMJD6 Regulates ER α Methylation on Arginine. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e87982.
149. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;316(3):878-83.
150. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)*. 2002;298(5600):1912-34.
151. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer research*. 1998;58(5):877-81.
152. Cheng J, Zhang C, Shapiro DJ. A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-alpha is required for down-regulation of gene expression by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology*. 2007;148(10):4634-41.
153. Chen D, Washbrook E, Sarwar N, Bates GJ, Pace PE, Thirunuvakkarasu V, et al. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene*. 2002;21(32):4921-31.
154. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, NY)*. 1995;270(5241):1491-4.
155. Dutertre M, Smith CL. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(7):1296-314.
156. Shah YM, Rowan BG. The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(3):732-48.
157. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J*. 1996;15(9):2174-83.
158. de Leeuw R, Neeffjes J, Michalides R. A role for estrogen receptor phosphorylation in the resistance to tamoxifen. *Int J Breast Cancer*. 2011;2011:232435.
159. Welsch CW, Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis: a review. *Cancer research*. 1977;37(4):951-63.
160. Kavarthapu R, Tsai Morris CH, Dufau ML. Prolactin induces up-regulation of its cognate receptor in breast cancer cells via transcriptional activation of its generic promoter by cross-talk between ERalpha and STAT5. *Oncotarget*. 2014;5(19):9079-91.

161. Dowsett M, Johnston S, Martin LA, Salter J, Hills M, Detre S, et al. Growth factor signalling and response to endocrine therapy: the Royal Marsden Experience. *Endocrine-related cancer*. 2005;12 Suppl 1:S113-7.
162. Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(2 Pt 2):865s-70s.
163. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(4):1978-84.
164. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(38):33006-14.
165. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(32):22296-302.
166. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *Journal of molecular endocrinology*. 2008;40(4):173-84.
167. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shupnik MA. Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology*. 2004;145(6):2730-8.
168. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS letters*. 2004;567(2-3):243-7.
169. Tharakan R, Lepont P, Singleton D, Kumar R, Khan S. Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2008;295(1-2):70-8.
170. Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001;77(1):19-27.
171. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22(2):317-30.
172. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene*. 2012.
173. Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*. 2000;39(38):11609-20.
174. Cheng X, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(13):10570-5.
175. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):561-70.

176. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):427-33.
177. Mourits MJ, GH DEB. Exogenous steroids for menopausal symptoms and breast/endometrial cancer risk. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2006;16 Suppl 2:494-6.
178. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2006;102(1-5):89-96.
179. Willey SC, Cocilovo C. Screening and follow-up of the patient at high risk for breast cancer. *Obstetrics and gynecology*. 2007;110(6):1404-16.
180. Jensen EV BG, Smith S, Kyser K, DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. 1971 Dec;34:55-70.
181. Li YZ, Zhao P, Han WD. Clinicopathological significance of LRP16 protein in 336 gastric carcinoma patients. *World J Gastroenterol*. 2009;15(38):4833-7.
182. Liao DX, Han WD, Zhao YL, Pu YD, Mu YM, Luo CH, et al. [Expression and clinical significance of LRP16 gene in human breast cancer]. *Ai Zheng*. 2006;25(7):866-70.
183. Shao Y, Li X, Lu Y, Liu L, Zhao P. Aberrant LRP16 protein expression in primary neuroendocrine lung tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6560-5.
184. Xi HQ, Zhao P, Han WD. Clinicopathological significance and prognostic value of LRP16 expression in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010;16(13):1644-8.
185. Zhao P, Lu Y, Han W. Clinicopathological significance and prognostic value of leukemia-related protein 16 expression in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2262-8.
186. Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. Molecular cloning and characterization of human WNT11. *Int J Mol Med*. 2001;8(6):651-6.
187. Zhu H, Mazor M, Kawano Y, Walker MM, Leung HY, Armstrong K, et al. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. *Cancer research*. 2004;64(21):7918-26.
188. Finn R, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen D, Desai A, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research*. 2009;11(5):R77.
189. Meng YG, Han WD, Zhao YL, Huang K, Si YL, Wu ZQ, et al. Induction of the LRP16 gene by estrogen promotes the invasive growth of Ishikawa human endometrial cancer cells through the downregulation of E-cadherin. *Cell research*. 2007;17(10):869-80.
190. Lin Z, Reierstad S, Huang CC, Bulun SE. Novel estrogen receptor-alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer research*. 2007;67(10):5017-24.
191. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacological reviews*. 2001;53(1):25-71.
192. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(4):643-58.
193. Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD, et al. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1999;69(1-6):45-50.
194. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;354(3):270-82.

195. Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *The Journal of pathology*. 2003;201(2):213-20.
196. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):293-325.
197. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *The Journal of pathology*. 1999;187(1):112-26.
198. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999;18(45):6145-57.
199. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(8):594-604.
200. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(9):713-22.
201. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):597-608.
202. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(9):713-22.
203. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
204. Sieh W, Kobel M, Longacre TA, Bowtell DD, deFazio A, Goodman MT, et al. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol*. 2013;14(9):853-62.
205. Voutsadakis IA. Hormone Receptors in Serous Ovarian Carcinoma: Prognosis, Pathogenesis, and Treatment Considerations. *Clin Med Insights Oncol*. 2016;10:17-25.
206. Suzanne A. W. Fuqua RS, Irma Parra, William E. Friedrichs, Jui-Lan Su, David D. McKee, Kimberly Slentz-Kesler, Linda B. Moore, Timothy M. Willson and John T. Moore. Expression of Wild-Type Estrogen Receptor β and Variant Isoforms in Human Breast Cancer. *Cancer research*. 1999;(59) (21):5425-8.
207. Kolkova Z, Casslen V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirstrom K, et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2012;5:9.
208. Burges A, Bruning A, Dannenmann C, Blankenstein T, Jeschke U, Shabani N, et al. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2010;281(3):511-7.
209. O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(4):851-66.
210. Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, et al. Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2012;7(9):e44787.
211. Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Lattrich C, Piendl G, Ortmann O. Estrogen receptor β 1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *The Journal of endocrinology*. 2007;193(3):421-33.
212. Chan KK, Leung TH, Chan DW, Wei N, Lau GT, Liu SS, et al. Targeting estrogen receptor subtypes (ERalpha and ERbeta) with selective ER modulators in ovarian cancer. *The Journal of endocrinology*. 2014;221(2):325-36.

213. Singh RR, Kumar R. Steroid hormone receptor signaling in tumorigenesis. *J Cell Biochem.* 2005;96(3):490-505.
214. Weinberg OK, Marquez-Garban DC, Pietras RJ. New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer. *Drug Resist Updat.* 2005;8(4):219-33.
215. An KC. Selective Estrogen Receptor Modulators. *Asian Spine J.* 2016;10(4):787-91.
216. Lane TF, Deng C, Elson A, Lyu MS, Kozak CA, Leder P. Expression of *Brcal* is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes Dev.* 1995;9(21):2712-22.
217. Marquis ST, Rajan JV, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin GY, Abel KJ, et al. The developmental pattern of *Brcal* expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. *Nat Genet.* 1995;11(1):17-26.
218. Aguas F, Martins A, Gomes TP, de Sousa M, Silva DP. Prophylaxis approach to asymptomatic post-menopausal women: breast cancer. *Maturitas.* 2005;52 Suppl 1:S23-31.
219. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(4):425-39.
220. Buzdar AU. Endocrine therapy in the treatment of metastatic breast cancer. *Semin Oncol.* 2001;28(3):291-304.
221. Wittmann BM, Sherk A, McDonnell DP. Definition of functionally important mechanistic differences among selective estrogen receptor down-regulators. *Cancer research.* 2007;67(19):9549-60.
222. van Kruchten M, de Vries EG, Glaudemans AW, van Lanschot MC, van Faassen M, Kema IP, et al. Measuring residual estrogen receptor availability during fulvestrant therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(1):72-81.
223. Massarweh S, Osborne CK, Jiang S, Wakeling AE, Rimawi M, Mohsin SK, et al. Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/neu-positive breast cancer. *Cancer research.* 2006;66(16):8266-73.
224. Wardell SE, Nelson ER, Chao CA, Alley HM, McDonnell DP. Evaluation of the pharmacological activities of RAD1901, a selective estrogen receptor degrader. *Endocrine-related cancer.* 2015;22(5):713-24.
225. De Savi C, Bradbury RH, Rabow AA, Norman RA, de Almeida C, Andrews DM, et al. Optimization of a Novel Binding Motif to (E)-3-(3,5-Difluoro-4-((1R,3R)-2-(2-fluoro-2-methylpropyl)-3-methyl-2,3,4,9-tetra hydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)phenyl)acrylic Acid (AZD9496), a Potent and Orally Bioavailable Selective Estrogen Receptor Downregulator and Antagonist. *J Med Chem.* 2015;58(20):8128-40.
226. Weir HM, Bradbury RH, Lawson M, Rabow AA, Buttar D, Callis RJ, et al. AZD9496: An Oral Estrogen Receptor Inhibitor That Blocks the Growth of ER-Positive and ESR1-Mutant Breast Tumors in Preclinical Models. *Cancer research.* 2016;76(11):3307-18.
227. Nahta R, O'Regan RM. Therapeutic implications of estrogen receptor signaling in HER2-positive breast cancers. *Breast cancer research and treatment.* 2012;135(1):39-48.
228. Drebin JA, Link VC, Greene MI. Monoclonal antibodies specific for the neu oncogene product directly mediate anti-tumor effects in vivo. *Oncogene.* 1988;2(4):387-94.

229. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2639-48.
230. Baselga J, Cortes J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, et al. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2012;366(2):109-19.
231. Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol.* 2010;28(7):1138-44.
232. Portera CC, Walshe JM, Rosing DR, Denduluri N, Berman AW, Vatas U, et al. Cardiac toxicity and efficacy of trastuzumab combined with pertuzumab in patients with [corrected] human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2008;14(9):2710-6.
233. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2005;353(16):1673-84.
234. Mao C, Patterson NM, Cherian MT, Aninye IO, Zhang C, Montoya JB, et al. A new small molecule inhibitor of estrogen receptor alpha binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. *The Journal of biological chemistry.* 2008;283(19):12819-30.
235. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Mihalic K, Fan YX, Xiao W, et al. Suppression of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. *Nature medicine.* 2004;10(1):40-7.
236. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews.* 2000;52(1):145-76.
237. Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in Cancer Biology.* 2004;14(3):181-5.
238. Lindley IJD, Westwick J, SL K, . Nomenclature announcement: The chemokines. *Immunol Today* 1993;14:24.
239. Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *Journal of Reproductive Immunology.* 2001;52(1-2):15-33.
240. Mantovani A, Dejana E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today.* 1989;10(11):370-5.
241. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology.* 2007;25:787-820.
242. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2001;166(8):5145-54.
243. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature.* 1997;387(6633):611-7.
244. Lolis EJFaE. STRUCTURE, FUNCTION, AND INHIBITION OF CHEMOKINES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* April 2002;42: 469-499.

245. Kohidai L, Csaba G. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine*. 1998;10(7):481-6.
246. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.
247. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001;2(2):102-7.
248. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001;2(2):95-101.
249. Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998;393(6685):595-9.
250. Dieu M-C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J-M, Oldham E, Aït-Yahia S, et al. Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(2):373-86.
251. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*. 1998;28(9):2760-9.
252. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000;404(6776):407-11.
253. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*. 2000;68(1):1-8.
254. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine*. 2003;21(1):48-9.
255. Borroni EM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R. Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacology & therapeutics*. 2010;127(1):1-8.
256. Lazenec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(3):133-44.
257. Pelchen-Matthews AS, Nathalie; Klasse, Per J.; Fraile-Ramos, Alberto; Marsh, Mark. Chemokine receptor trafficking and viral replication [Pathogen Subversion Of Cellular Immunity]. *Immunological Reviews*. April 1999;168:33-49.
258. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2(2):129-34.
259. ROBERT FREDRIKSSON MCLM, LARS-GUSTAV LUNDIN, and HELGI B. SCHIO" TH. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. 2003;Vol. 63, No. 6.
260. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, et al. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998;160(3):1522-31.
261. Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, et al. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science (New York, NY)*. 1989;244(4904):569-72.
262. Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dumont JE, Vassart G. Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(7):1917.

263. Libert F, Passage E, Parmentier M, Simons MJ, Vassart G, Mattei MG. Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. *Genomics*. 1991;11(1):225-7.
264. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(42):35760-6.
265. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. 2006;203(9):2201-13.
266. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*. 1997;16(23):6996-7007.
267. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998;392(6676):565-8.
268. Berahovich RD, Penfold ME, Schall TJ. Nonspecific CXCR7 antibodies. *Immunol Lett*. 2010;133(2):112-4.
269. Broberg K, Zhang M, Strombeck B, Isaksson M, Nilsson M, Mertens F, et al. Fusion of RDC1 with HMGA2 in lipomas as the result of chromosome aberrations involving 2q35-37 and 12q13-15. *Int J Oncol*. 2002;21(2):321-6.
270. Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2006;176(4):2197-207.
271. D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, Hoxie JA, Clark-Lewis I, Melchers F, et al. The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *European journal of immunology*. 1997;27(7):1788-93.
272. Honczarenko M, Douglas RS, Mathias C, Lee B, Ratajczak MZ, Silberstein LE. SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells. *Blood*. 1999;94(9):2990-8.
273. Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, et al. Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and $G\alpha(i)$ activation: *J Biol Chem*. 2011 Aug 19;286(33):29440. doi:10.1074/jbc.A111.600270.
274. Roland J, Murphy BJ, Ahr B, Robert-Hebmann V, Delauzun V, Nye KE, et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling. *Blood*. 2003;101(2):399-406.
275. Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol*. 2008;198(1-2):9-13.
276. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett*. 2012;145(1-2):30-8.
277. Ulvmar MH, Hub E, Rot A. Atypical chemokine receptors. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):556-68.
278. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*. 2010;5(2):e9175.
279. Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, et al. CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int J Cancer*. 2009;125(9):2229-35.

280. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(40):15735-40.
281. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol*. 2009;75(5):1240-7.
282. Luker KE, Gupta M, Steele JM, Foerster BR, Luker GD. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*. 2009;11(10):1022-35.
283. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):628-32.
284. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*. 2009;113(24):6085-93.
285. Siervo F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14759-64.
286. Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*. 2008;112(1):34-44.
287. Salanga CL, O'Hayre M, Handel T. Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(8):1370-86.
288. Thelen M, Munoz LM, Rodriguez-Frade JM, Mellado M. Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(1):38-43.
289. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50-6.
290. Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(3):463-73.
291. Li M, Ransohoff RM. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(2):111-5.
292. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1alpha) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med*. 2008;205(11):2643-55.
293. Sanchez-Martin L, Estechea A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood*. 2011;117(1):88-97.
294. Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends in molecular medicine*. 2013;19(1):12-22.
295. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Gladue RP, et al. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*. 1998;187(12):2009-21.
296. Eva C, Sprengel R. A novel putative G protein-coupled receptor highly expressed in lung and testis. *DNA Cell Biol*. 1993;12(5):393-9.

297. Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer research*. 2010;70(8):3299-308.
298. Tripathi V, Verma R, Dinda A, Malhotra N, Kaur J, Luthra K. Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta. *J Clin Immunol*. 2009;29(3):379-86.
299. Neusser MA, Kraus AK, Regele H, Cohen CD, Fehr T, Kerjaschki D, et al. The chemokine receptor CXCR7 is expressed on lymphatic endothelial cells during renal allograft rejection. *Kidney Int*. 2010;77(9):801-8.
300. Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, et al. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(11):3211-20.
301. Tarnowski M, Liu R, Wysoczynski M, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells. *Eur J Haematol*. 2010;85(6):472-83.
302. Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;401(4):509-15.
303. Van Rechem C, Rood BR, Touka M, Pinte S, Jenal M, Guerardel C, et al. Scavenger chemokine (CXC motif) receptor 7 (CXCR7) is a direct target gene of HIC1 (hypermethylated in cancer 1). *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(31):20927-35.
304. Wang H, Beaty N, Chen S, Qi CF, Masiuk M, Shin DM, et al. The CXCR7 chemokine receptor promotes B-cell retention in the splenic marginal zone and serves as a sink for CXCL12. *Blood*. 2012;119(2):465-8.
305. Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, et al. A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. 2000;74(2):619-26.
306. Delgado-Martin C, Escribano C, Pablos JL, Riol-Blanco L, Rodriguez-Fernandez JL. Chemokine CXCL12 uses CXCR4 and a signaling core formed by bifunctional Akt, extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2, and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) proteins to control chemotaxis and survival simultaneously in mature dendritic cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(43):37222-36.
307. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9448-53.
308. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8.
309. Lavine KJ, Ornitz DM. Shared circuitry: developmental signaling cascades regulate both embryonic and adult coronary vasculature. *Circulation research*. 2009;104(2):159-69.
310. Gamba L, Cubedo N, Ghysen A, Lutfalla G, Dambly-Chaudiere C. Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(14):6358-63.
311. Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, et al. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(6):e20898.

312. Zhang F, Kang H, Xu Q. Estrogen increases secretion of stromal cell derived factor-1 in human breast cancer cells. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(12):5529-34.
313. Deupi X, Standfuss J. Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Struct Biol*. 2011;21(4):541-51.
314. Carpenter B, Nehme R, Warne T, Leslie AG, Tate CG. Structure of the adenosine A(2A) receptor bound to an engineered G protein. *Nature*. 2016;536(7614):104-7.
315. Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(11):9895-903.
316. Proost P, Mortier A, Loos T, Vandercappellen J, Gouwy M, Ronsse I, et al. Proteolytic processing of CXCL11 by CD13/aminopeptidase N impairs CXCR3 and CXCR7 binding and signaling and reduces lymphocyte and endothelial cell migration. *Blood*. 2007;110(1):37-44.
317. Decaillet FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(37):32188-97.
318. Grymula K, Tarnowski M, Wysoczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, et al. Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer*. 2010;127(11):2554-68.
319. Odemis V, Boosmann K, Heinen A, Kury P, Engele J. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 7):1081-8.
320. Wang C, Mayer JA, Mazumdar A, Fertuck K, Kim H, Brown M, et al. Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2011;25(9):1527-38.
321. Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(7):4283-94.
322. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*. 2008;132(3):463-73.
323. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, et al. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*. 2011;208(2):327-39.
324. Dambly-Chaudiere C, Cubedo N, Ghysen A. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol*. 2007;7:23.
325. Valentin G, Haas P, Gilmour D. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Curr Biol*. 2007;17(12):1026-31.
326. Zabel BA, Lewen S, Berahovich RD, Jaen JC, Schall TJ. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2011;10:73.
327. Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MK, Smit MJ, Leurs R. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PLoS One*. 2012;7(3):e34192.

328. Ray P, Mihalko LA, Coggins NL, Moudgil P, Ehrlich A, Luker KE, et al. Carboxy-terminus of CXCR7 Regulates Receptor Localization and Function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(4):669-78.
329. Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Winkler JS, Coggins NL, et al. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene.* 2012;31(45):4750-8.
330. Cubedo N, Cerdan E, Sapede D, Rossel M. CXCR4 and CXCR7 cooperate during tangential migration of facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci.* 2009;40(4):474-84.
331. Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med.* 2008;205(2):479-90.
332. Sanchez-Alcaniz JA, Haegel S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, et al. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron.* 2011;69(1):77-90.
333. Sasado T, Yasuoka A, Abe K, Mitani H, Furutani-Seiki M, Tanaka M, et al. Distinct contributions of CXCR4b and CXCR7/RDC1 receptor systems in regulation of PGC migration revealed by medaka mutants *kazura* and *yanagi*. *Dev Biol.* 2008;320(2):328-39.
334. Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, et al. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2009;183(5):3204-11.
335. Haas P, Gilmour D. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev Cell.* 2006;10(5):673-80.
336. Li X, Zhu M, Penfold ME, Koenen RR, Thiemann A, Heyll K, et al. Activation of CXCR7 limits atherosclerosis and improves hyperlipidemia by increasing cholesterol uptake in adipose tissue. *Circulation.* 2014;129(11):1244-53.
337. Torossian F, Anginot A, Chabanon A, Clay D, Guerton B, Desterke C, et al. CXCR7 participates in CXCL12-induced CD34+ cell cycling through beta-arrestin-dependent Akt activation. *Blood.* 2014;123(2):191-202.
338. Yu H, Zhang L, Liu P. CXCR7 signaling induced epithelial-mesenchymal transition by AKT and ERK pathways in epithelial ovarian carcinomas. *Tumour Biol.* 2015;36(3):1679-83.
339. Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R128.
340. Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer research.* 2011;71(9):3268-77.
341. Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J Virol.* 2008;82(15):7456-66.
342. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(4):709-22.
343. Wurth R, Barbieri F, Bajetto A, Pattarozzi A, Gatti M, Porcile C, et al. Expression of CXCR7 chemokine receptor in human meningioma cells and in intratumoral microvasculature. *J Neuroimmunol.* 2011;234(1-2):115-23.
344. Scotton CJ, Wilson JL, Milliken D, Stamp G, Balkwill FR. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer research.* 2001;61(13):4961-5.

345. Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research*. 2002;62(20):5930-8.
346. Guo Q, Gao BL, Zhang XJ, Liu GC, Xu F, Fan QY, et al. CXCL12-CXCR4 Axis Promotes Proliferation, Migration, Invasion, and Metastasis of Ovarian Cancer. *Oncol Res*. 2014;22(5-6):247-58.
347. Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecologic oncology*. 2006;103(1):226-33.
348. Mao TL, Fan KF, Liu CL. Targeting the CXCR4/CXCL12 axis in treating epithelial ovarian cancer. *Gene Ther*. 2017;24(10):621-9.
349. Popple A, Durrant LG, Spendlove I, Rolland P, Scott IV, Deen S, et al. The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2012;106(7):1306-13.
350. Salomonsson E, Stacer AC, Ehrlich A, Luker KE, Luker GD. Imaging CXCL12-CXCR4 Signaling in Ovarian Cancer Therapy. *PLoS One*. 2013;8(1).
351. Yu Y, Li H, Xue B, Jiang X, Huang K, Ge J, et al. SDF-1/CXCR7 axis enhances ovarian cancer cell invasion by MMP-9 expression through p38 MAPK pathway. *DNA Cell Biol*. 2014;33(8):543-9.
352. Fischer G, Bang H, Mech C. [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomed Biochim Acta*. 1984;43(10):1101-11.
353. Park ST, Aldape RA, Futer O, DeCenzo MT, Livingston DJ. PPIase catalysis by human FK506-binding protein proceeds through a conformational twist mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(5):3316-24.
354. Schiene-Fischer C, Aumuller T, Fischer G. Peptide bond cis/trans isomerases: a biocatalysis perspective of conformational dynamics in proteins. *Top Curr Chem*. 2013;328:35-67.
355. Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem*. 2003;3(12):1315-47.
356. Pemberton TJ. Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC Genomics*. 2006;7:244.
357. Unal CM, Steinert M. Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):544-71.
358. Lu KP, Hanes SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*. 1996;380(6574):544-7.
359. Uchida T, Fujimori F, Tradler T, Fischer G, Rahfeld JU. Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS letters*. 1999;446(2-3):278-82.
360. Pemberton TJ, Kay JE. Identification and comparative analysis of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires of *H. sapiens*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *S. cerevisiae* and *Sz. pombe*. *Comp Funct Genomics*. 2005;6(5-6):277-300.
361. Lu KP, Zhou XZ. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(11):904-16.

362. Lu PJ, Zhou XZ, Shen M, Lu KP. Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5406):1325-8.
363. Finn G, Lu KP. Phosphorylation-specific prolyl isomerase Pin1 as a new diagnostic and therapeutic target for cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8(3):223-9.
364. Pastorino L, Sun A, Lu PJ, Zhou XZ, Balastik M, Finn G, et al. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production. *Nature*. 2006;440(7083):528-34.
365. Ryo A, Liou Y-C, Lu KP, Wulf G. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer. *Journal of cell science*. 2003;116(5):773-83.
366. Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, et al. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular cell*. 2000;6(4):873-83.
367. Werner-Allen JW, Lee CJ, Liu P, Nicely NI, Wang S, Greenleaf AL, et al. cis-Proline-mediated Ser(P)5 dephosphorylation by the RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase Ssu72. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(7):5717-26.
368. Nakamura K, Greenwood A, Binder L, Bigio EH, Denial S, Nicholson L, et al. Proline isomer-specific antibodies reveal the early pathogenic tau conformation in Alzheimer's disease. *Cell*. 2012;149(1):232-44.
369. Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature*. 1999;399(6738):784-8.
370. Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP. Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 1999;56(9-10):788-806.
371. Wulf G, Garg P, Liou YC, Iglehart D, Lu KP. Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis. *EMBO J*. 2004;23(16):3397-407.
372. Suizu F, Ryo A, Wulf G, Lim J, Lu KP. Pin1 regulates centrosome duplication, and its overexpression induces centrosome amplification, chromosome instability, and oncogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(4):1463-79.
373. Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, et al. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):308-18.
374. Yeh ES, Lew BO, Means AR. The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouse embryo fibroblasts to genomic instability. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(1):241-51.
375. Lu Z, Hunter T. Degradation of activated protein kinases by ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:435-75.
376. Dougherty MK, Muller J, Ritt DA, Zhou M, Zhou XZ, Copeland TD, et al. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular cell*. 2005;17(2):215-24.
377. Khanal P, Namgoong GM, Kang BS, Woo ER, Choi HS. The prolyl isomerase Pin1 enhances HER-2 expression and cellular transformation via its interaction with mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase 1. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(3):606-16.
378. Park JE, Lee JA, Park SG, Lee DH, Kim SJ, Kim HJ, et al. A critical step for JNK activation: isomerization by the prolyl isomerase Pin1. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):153-61.

379. Liao Y, Wei Y, Zhou X, Yang JY, Dai C, Chen YJ, et al. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1 is critical for the regulation of PKB/Akt stability and activation phosphorylation. *Oncogene*. 2009;28(26):2436-45.
380. Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;265(3):658-63.
381. Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, et al. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(3):1335-40.
382. Atchison FW, Means AR. Spermatogonial depletion in adult Pin1-deficient mice. *Biol Reprod*. 2003;69(6):1989-97.
383. Lufei C, Koh TH, Uchida T, Cao X. Pin1 is required for the Ser727 phosphorylation-dependent Stat3 activity. *Oncogene*. 2007;26(55):7656-64.
384. Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, et al. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(13):11593-603.
385. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*. 1998;12(22):3499-511.
386. Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol*. 2001;3(9):793-801.
387. Farrell AS, Pelz C, Wang X, Daniel CJ, Wang Z, Su Y, et al. Pin1 regulates the dynamics of c-Myc DNA binding to facilitate target gene regulation and oncogenesis. *Molecular and cellular biology*. 2013;33(15):2930-49.
388. Stanya KJ, Liu Y, Means AR, Kao HY. Cdk2 and Pin1 negatively regulate the transcriptional corepressor SMRT. *J Cell Biol*. 2008;183(1):49-61.
389. Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 1997;11(11):1464-78.
390. Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, et al. Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(36):23980-8.
391. Reineke EL, Lam M, Liu Q, Liu Y, Stanya KJ, Chang KS, et al. Degradation of the tumor suppressor PML by Pin1 contributes to the cancer phenotype of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(3):997-1006.
392. Nicole Tsang YH, Wu XW, Lim JS, Wee Ong C, Salto-Tellez M, Ito K, et al. Prolyl isomerase Pin1 downregulates tumor suppressor RUNX3 in breast cancer. *Oncogene*. 2013;32(12):1488-96.
393. Milne DM, Campbell DG, Caudwell FB, Meek DW. Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(12):9253-60.
394. Toledo F, Lee CJ, Krummel KA, Rodewald LW, Liu CW, Wahl GM. Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(4):1425-32.
395. Yeh ES, Means AR. PIN1, the cell cycle and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):381-8.
396. La Montagna R, Caligiuri I, Giordano A, Rizzolio F. Pin1 and nuclear receptors: a new language? *J Cell Physiol*. 2013;228(9):1799-801.

397. Rajbhandari P, Finn G, Solodin NM, Singarapu KK, Sahu SC, Markley JL, et al. Regulation of estrogen receptor alpha N-terminus conformation and function by peptidyl prolyl isomerase Pin1. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(2):445-57.
398. La Montagna R, Caligiuri I, Maranta P, Lucchetti C, Esposito L, Paggi MG, et al. Androgen receptor serine 81 mediates Pin1 interaction and activity. *Cell Cycle*. 2012;11(18):3415-20.
399. Chen HZ, Li L, Wang WJ, Du XD, Wen Q, He JP, et al. Prolyl isomerase Pin1 stabilizes and activates orphan nuclear receptor TR3 to promote mitogenesis. *Oncogene*. 2012;31(23):2876-87.
400. van Tiel CM, Kurakula K, Koenis DS, van der Wal E, de Vries CJ. Dual function of Pin1 in NR4A nuclear receptor activation: enhanced activity of NR4As and increased Nur77 protein stability. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(10):1894-904.
401. Brondani V, Schefer Q, Hamy F, Klimkait T. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;328(1):6-13.
402. Gianni M, Boldetti A, Guarnaccia V, Rambaldi A, Parrella E, Raska I, Jr., et al. Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid via stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. *Cancer research*. 2009;69(3):1016-26.
403. Fujimoto Y, Shiraki T, Horiuchi Y, Waku T, Shigenaga A, Otaka A, et al. Proline cis/trans-isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity through the direct binding to the activation function-1 domain. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(5):3126-32.
404. Rajbhandari P, Schalper KA, Solodin NM, Ellison-Zelski SJ, Ping Lu K, Rimm DL, et al. Pin1 modulates ERalpha levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene*. 2014;33(11):1438-47.
405. Dimmeler S, Carret C, Buccione R. *EMBO molecular medicine: fast forward*. *EMBO Mol Med*. 2014;6(1):1.
406. Luo ML, Gong C, Chen CH, Lee DY, Hu H, Huang P, et al. Prolyl isomerase Pin1 acts downstream of miR200c to promote cancer stem-like cell traits in breast cancer. *Cancer research*. 2014;74(13):3603-16.
407. Rustighi A, Zannini A, Campaner E, Ciani Y, Piazza S, Del Sal G. PIN1 in breast development and cancer: a clinical perspective. *Cell Death And Differentiation*. 2016;24:200.
408. Ding Q, Huo L, Yang JY, Xia W, Wei Y, Liao Y, et al. Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer. *Cancer research*. 2008;68(15):6109-17.
409. Girardini JE, Napoli M, Piazza S, Rustighi A, Marotta C, Radaelli E, et al. A Pin1/mutant p53 axis promotes aggressiveness in breast cancer. *Cancer Cell*. 2011;20(1):79-91.
410. Luo ML, Gong C, Chen CH, Hu H, Huang P, Zheng M, et al. The Rab2A GTPase promotes breast cancer stem cells and tumorigenesis via Erk signaling activation. *Cell Rep*. 2015;11(1):111-24.
411. Rustighi A, Tiberi L, Soldano A, Napoli M, Nuciforo P, Rosato A, et al. The prolyl-isomerase Pin1 is a Notch1 target that enhances Notch1 activation in cancer. *Nat Cell Biol*. 2009;11(2):133-42.
412. You H, Zheng H, Murray SA, Yu Q, Uchida T, Fan D, et al. IGF-1 induces Pin1 expression in promoting cell cycle S-phase entry. *J Cell Biochem*. 2002;84(2):211-6.

413. Lam PB, Burga LN, Wu BP, Hofstatter EW, Lu KP, Wulf GM. Prolyl isomerase Pin1 is highly expressed in Her2-positive breast cancer and regulates erbB2 protein stability. *Mol Cancer*. 2008;7:91.
414. Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J*. 2001;20(13):3459-72.
415. Eckerdt F, Yuan J, Saxena K, Martin B, Kappel S, Lindenau C, et al. Polo-like kinase 1-mediated phosphorylation stabilizes Pin1 by inhibiting its ubiquitination in human cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(44):36575-83.
416. Rizzolio F, Lucchetti C, Caligiuri I, Marchesi I, Caputo M, Klein-Szanto AJ, et al. Retinoblastoma tumor-suppressor protein phosphorylation and inactivation depend on direct interaction with Pin1. *Cell Death Differ*. 2012;19(7):1152-61.
417. Chan JY. A clinical overview of centrosome amplification in human cancers. *Int J Biol Sci*. 2011;7(8):1122-44.
418. Chen CH, Chang CC, Lee TH, Luo M, Huang P, Liao PH, et al. SENP1 deSUMOylates and regulates Pin1 protein activity and cellular function. *Cancer research*. 2013;73(13):3951-62.
419. Rangasamy V, Mishra R, Sondarva G, Das S, Lee TH, Bakowska JC, et al. Mixed-lineage kinase 3 phosphorylates prolyl-isomerase Pin1 to regulate its nuclear translocation and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(21):8149-54.
420. Rustighi A, Zannini A, Tiberi L, Sommaggio R, Piazza S, Sorrentino G, et al. Prolyl-isomerase Pin1 controls normal and cancer stem cells of the breast. *EMBO Mol Med*. 2014;6(1):99-119.
421. Kim MR, Choi HK, Cho KB, Kim HS, Kang KW. Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2009;100(10):1834-41.
422. Kim MR, Choi HS, Heo TH, Hwang SW, Kang KW. Induction of vascular endothelial growth factor by peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;369(2):547-53.
423. Khanal P, Yun HJ, Lim SC, Ahn SG, Yoon HE, Kang KW, et al. Proyl isomerase Pin1 facilitates ubiquitin-mediated degradation of cyclin-dependent kinase 10 to induce tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene*. 2012;31(34):3845-56.
424. Furuya M, Suyama T, Usui H, Kasuya Y, Nishiyama M, Tanaka N, et al. Up-regulation of CXC chemokines and their receptors: implications for proinflammatory microenvironments of ovarian carcinomas and endometriosis. *Human pathology*. 2007;38(11):1676-87.
425. Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(3):1025-8.
426. Cuna S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2004;94(1):25-32.
427. Hillier SG, Anderson RA, Williams AR, Tetsuka M. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in cultured human ovarian surface epithelial cells. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(8):811-5.

428. Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, et al. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer research*. 1998;58(23):5367-73.
429. Beral V, Million Women Study C, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2007;369(9574):1703-10.
430. La Vecchia C. Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *Eur J Cancer Prev*. 2016.
431. Zhou B, Sun Q, Cong R, Gu H, Tang N, Yang L, et al. Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 2008;108(3):641-51.
432. Malvezzi M, Carioli G, Rodriguez T, Negri E, La Vecchia C. Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Ann Oncol*. 2016.
433. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.
434. Hildebrand JS, Gapstur SM, Feigelson HS, Teras LR, Thun MJ, Patel AV. Postmenopausal hormone use and incident ovarian cancer: Associations differ by regimen. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2928-35.
435. Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstetrics and gynecology*. 2008;111(1):144-51.
436. Kyriakidis I, Papaioannidou P. Estrogen receptor beta and ovarian cancer: a key to pathogenesis and response to therapy. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2016;293(6):1161-8.
437. Ciucci A, Zannoni GF, Travaglia D, Petrillo M, Scambia G, Gallo D. Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ERbeta) isoforms ERbeta1, ERbeta2, and ERbeta5 in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2014;132(2):351-9.
438. Liu CF, Liu SY, Min XY, Ji YY, Wang N, Liu D, et al. The prognostic value of CXCR4 in ovarian cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(3):e92629.
439. Sanchez-Martin L, Sanchez-Mateos P, Cabanas C. CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med*. 2013;19(1):12-22.
440. Wu W, Qian L, Chen X, Ding B. Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13217-24.
441. Tang X, Li X, Li Z, Liu Y, Yao L, Song S, et al. Downregulation of CXCR7 inhibits proliferative capacity and stem cell-like properties in breast cancer stem cells. *Tumour Biol*. 2016.
442. Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, et al. The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1alpha-induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(3):604-16.
443. Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, et al. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS One*. 2012;7(8):e43665.
444. Jaszczynska-Nowinka K, Rucinski M, Ziolkowska A, Markowska A, Malendowicz LK. Expression of SDF-1 and CXCR4 transcript variants and CXCR7 in epithelial ovarian cancer. *Oncology letters*. 2014;7(5):1618-24.
445. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003;17(5):792-803.

446. Lau KM, Mok SC, Ho SM. Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5722-7.
447. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
448. Edjekouane L, Benhadjeba S, Jangal M, Fleury H, Gevry N, Carmona E, et al. Proximal and distal regulation of the HYAL1 gene cluster by the estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Oncotarget*. 2016.
449. Weigel NL, Moore NL. Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *NuclReceptSignal*. 2007;5:e005.
450. Wang J, Shiozawa Y, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2008;283(7):4283-94.
451. Kerdivel G, Boudot A, Pakdel F. Estrogen represses CXCR7 gene expression by inhibiting the recruitment of NFkappaB transcription factor at the CXCR7 promoter in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;431(4):729-33.
452. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Kobayashi S, et al. Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERalpha) serine 118 and high phosphorylation of ERalpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(3):755-63.
453. Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, Michalides R, Stal O, Linn S, et al. Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(24):1725-9.
454. Chen M, Cui YK, Huang WH, Man K, Zhang GJ. Phosphorylation of estrogen receptor alpha at serine 118 is correlated with breast cancer resistance to tamoxifen. *Oncol Lett*. 2013;6(1):118-24.
455. Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2009.
456. Wani N, Nasser MW, Ahirwar DK, Zhao H, Miao Z, Shilo K, et al. C-X-C motif chemokine 12/C-X-C chemokine receptor type 7 signaling regulates breast cancer growth and metastasis by modulating the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res*. 2014;16(3):R54.
457. Zheng K, Li HY, Su XL, Wang XY, Tian T, Li F, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2010;29:31.
458. Kommos S, Gilks CB, du Bois A, Kommos F. Ovarian carcinoma diagnosis: the clinical impact of 15 years of change. *Br J Cancer*. 2016.
459. Gallo D, Ferlini C, Scambia G. The epithelial-mesenchymal transition and the estrogen-signaling in ovarian cancer. *Curr Drug Targets*. 2010;11(4):474-81.
460. Jeon SY, Hwang KA, Choi KC. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;158:1-8.
461. Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 2008;22(9):2085-98.

462. Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, Tremblay A, Provencher DM, Mes-Masson AM, et al. Subtype specific elevated expression of hyaluronidase-1 (HYAL-1) in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2011;6(6):e20705.
463. Rodrigue-Way A, Caron V, Bilodeau S, Keil S, Hassan M, Levy E, et al. Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPARgamma/PGC-1alpha pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J*. 2014;28:1910-23.
464. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene*. 2013;32(1):117-26.
465. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal*. 2008;6:e003.
466. Marquette C, Nabell L. Chemotherapy-resistant metastatic breast cancer. *Current treatment options in oncology*. 2012;13(2):263-75.
467. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast cancer research and treatment*. 2006;96(2):131-46.
468. Yue F, Zhang GP, Jin HM. Effects of basic fibroblast growth factor on the expressions of angiogenic gene profile and cyclooxygenase-2 in brain microvascular endothelial cells. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*. 2006;58(2):124-8.
469. Gothlin Eremo A, Tina E, Wegman P, Stal O, Fransen K, Fornander T, et al. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. *Int J Oncol*. 2015;47(4):1311-20.
470. Stires H, Heckler MM, Fu X, Li Z, Grasso CS, Quist MJ, et al. Integrated molecular analysis of Tamoxifen-resistant invasive lobular breast cancer cells identifies MAPK and GRM/mGluR signaling as therapeutic vulnerabilities. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017.
471. Tian M, Schiemann WP. TGF-beta Stimulation of EMT Programs Elicits Non-genomic ER-alpha Activity and Anti-estrogen Resistance in Breast Cancer Cells. *J Cancer Metastasis Treat*. 2017;3:150-60.
472. Vethakanraj HS, Sesurajan BP, Padmanaban VP, Jayaprakasam M, Murali S, Sekar AK. Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ERalpha. *Anticancer Drugs*. 2018;29(1):50-60.
473. Goldhirsch A. What are the long-term effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer? : Nature Publishing Group.
474. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(4):557-68.
475. Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, Cui Y, Osborne CK, Fuqua SA. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(22):7490-9.
476. Zhao C, Lam EW, Sunter A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC, et al. Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene*. 2003;22(48):7600-6.

477. Treeck O, Juhasz-Boess I, Latrarch C, Horn F, Goerse R, Ortmann O. Effects of exon-deleted estrogen receptor beta transcript variants on growth, apoptosis and gene expression of human breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 2008;110(3):507-20.
478. Markey GC, Cullen R, Diggin P, Hill AD, Mc Dermott EW, O'Higgins NJ, et al. Estrogen receptor-beta mRNA is associated with adverse outcome in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. 2009;30(4):171-5.
479. Speirs V, Malone C, Walton DS, Kerin MJ, Atkin SL. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer research*. 1999;59(21):5421-4.
480. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J*. 1992;11(3):1025-33.
481. Warnmark A, Wikstrom A, Wright AP, Gustafsson JA, Hard T. The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(49):45939-44.
482. Jager M, Zhang Y, Bieschke J, Nguyen H, Dendle M, Bowman ME, et al. Structure-function-folding relationship in a WW domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(28):10648-53.
483. Liou YC, Zhou XZ, Lu KP. Prolyl isomerase Pin1 as a molecular switch to determine the fate of phosphoproteins. *Trends in biochemical sciences*. 2011;36(10):501-14.
484. Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer research*. 2003;63(19):6244-51.
485. Leung KW, Tsai CH, Hsiao M, Tseng CJ, Ger LP, Lee KH, et al. Pin1 overexpression is associated with poor differentiation and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports*. 2009;21(4):1097-104.
486. Ryo A, Uemura H, Ishiguro H, Saitoh T, Yamaguchi A, Perrem K, et al. Stable suppression of tumorigenicity by Pin1-targeted RNA interference in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(20):7523-31.
487. Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang DG. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *The American journal of pathology*. 2004;164(5):1727-37.
488. Lu Z, Hunter T. Prolyl isomerase Pin1 in cancer. *Cell research*. 2014;24(9):1033-49.
489. Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, et al. Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Molecular and cellular biology*. 2005;25(21):9687-99.
490. Lu PJ, Zhou XZ, Liou YC, Noel JP, Lu KP. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(4):2381-4.
491. Borgna S, Armellini M, di Gennaro A, Maestro R, Santarosa M. Mesenchymal traits are selected along with stem features in breast cancer cells grown as mammospheres. *Cell Cycle*. 2012;11(22):4242-51.
492. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2010;15(2):253-60.

493. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15.
494. Schutkowski M, Bernhardt A, Zhou XZ, Shen M, Reimer U, Rahfeld JU, et al. Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry*. 1998;37(16):5566-75.
495. Orlicky S, Tang X, Willems A, Tyers M, Sicheri F. Structural basis for phosphodependent substrate selection and orientation by the SCFCdc4 ubiquitin ligase. *Cell*. 2003;112(2):243-56.
496. Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1999;13(9):1522-34.
497. Rajbhandari P, Finn G, Solodin NM, Singarapu KK, Sahu SC, Markley JL, et al. Regulation of Estrogen Receptor α N-Terminus Conformation and Function by Peptidyl Prolyl Isomerase Pin1. *Molecular and cellular biology*. 2012;32(2):445-57.
498. Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(15):5281-95.
499. Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2012.
500. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
501. Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *The American journal of pathology*. 1993;143(6):1731-42.
502. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9.
503. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):76-83.
504. Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, Galtier F, et al. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol*. 2007;9(4):470-8.
505. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology*. 2007;148(3):1009-18.
506. Gebauer F, Tachezy M, Effenberger K, von Loga K, Zander H, Marx A, et al. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of surgical oncology*. 2011;104(2):140-5.
507. Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, Lokeshwar SD, Gomez CS, Benitez A, et al. C-X-C chemokine receptor 7: a functionally associated molecular marker for bladder cancer. *Cancer*. 2013;119(1):61-71.
508. Bieche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S, Le Corre L, et al. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(4):1039-52.

509. Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Munoz A, Mor G. Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstetrics and gynecology*. 2000;96(3):417-21.
510. Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2006;231(2):151-7.
511. Halon A, Nowak-Markwitz E, Maciejczyk A, Pudelko M, Gansukh T, Gyorffy B, et al. Loss of estrogen receptor beta expression correlates with shorter overall survival and lack of clinical response to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Anticancer Res*. 2011;31(2):711-8.
512. Davidson B, Trope CG, Reich R. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Front Oncol*. 2012;2:33.
513. Huang RY, Chung VY, Thiery JP. Targeting pathways contributing to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial ovarian cancer. *Curr Drug Targets*. 2012;13(13):1649-53.
514. Davidson B, Holth A, Hellesylt E, Tan TZ, Huang RY, Trope C, et al. The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Human pathology*. 2015;46(1):1-8.
515. Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, et al. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2014;7:76.
516. Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1279-93.
517. Yoshida S, Furukawa N, Haruta S, Tanase Y, Kanayama S, Noguchi T, et al. Expression profiles of genes involved in poor prognosis of epithelial ovarian carcinoma: a review. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*. 2009;19(6):992-7.
518. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011;474(7353):609-15.
519. Ponnusamy MP, Lakshmanan I, Jain M, Das S, Chakraborty S, Dey P, et al. MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: a novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(42):5741-54.
520. Chen D, Zhang Y, Wang J, Chen J, Yang C, Cai K, et al. MicroRNA-200c overexpression inhibits tumorigenicity and metastasis of CD117+CD44+ ovarian cancer stem cells by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):50.
521. Lester RD, Jo M, Montel V, Takimoto S, Gonias SL. uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol*. 2007;178(3):425-36.
522. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*. 2008;10(3):295-305.
523. Lopez-Novoa JM, Nieto MA. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med*. 2009;1(6-7):303-14.
524. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009;15(5):416-28.
525. Prasanphanich AF, Arencibia CA, Kemp ML. Redox processes inform multivariate transdifferentiation trajectories associated with TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:1-13.

526. Wu YC, Tang SJ, Sun GH, Sun KH. CXCR7 mediates TGFbeta1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer. *Oncogene*. 2016;35(16):2123-32.
527. Rupertus K, Sinistra J, Scheuer C, Nickels RM, Schilling MK, Menger MD, et al. Interaction of the chemokines I-TAC (CXCL11) and SDF-1 (CXCL12) in the regulation of tumor angiogenesis of colorectal cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 2014;31(4):447-59.
528. Hao M, Zheng J, Hou K, Wang J, Chen X, Lu X, et al. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. *Biochemical pharmacology*. 2012;84(2):204-14.
529. Lin L, Han MM, Wang F, Xu LL, Yu HX, Yang PY. CXCR7 stimulates MAPK signaling to regulate hepatocellular carcinoma progression. *Cell death & disease*. 2014;5:e1488.
530. Xue TC, Chen RX, Han D, Chen J, Xue Q, Gao DM, et al. Down-regulation of CXCR7 inhibits the growth and lung metastasis of human hepatocellular carcinoma cells with highly metastatic potential. *Experimental and therapeutic medicine*. 2012;3(1):117-23.
531. Anbalagan M, Rowan BG. Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;418, Part 3:264-72.
532. Murphy LC, Niu Y, Snell L, Watson P. Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(17):5902-6.
533. Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, et al. Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer research*. 2006;66(20):10162-70.
534. Martinez-Gonzalez J, Badimon L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):609-18.
535. Maxwell MA, Muscat GEO. The NR4A subgroup: immediate early response genes. *Nucl Recept Signal*. 2006;4.
536. Pols TW, Bonta PI, de Vries CJ. NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(5):515-20.
537. van Tiel CM, de Vries CJM. NR4A in the vessel wall. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2012;130(3):186-93.
538. Zhao Y, Bruemmer D. NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(8):1535-41.
539. Voutsadakis IA. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(1).
540. King MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science (New York, NY)*. 2003;302(5645):643-6.
541. Beral V, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2007;369(9574):1703-10.
542. Lacey JV, Jr., Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2002;288(3):334-41.
543. Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001;285(11):1460-5.

544. Lukanova A, Kaaks R. Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(1):98-107.
545. Chen M, Cui Y, Huang W, Man K, Zhang G. Phosphorylation of estrogen receptor α at serine 118 is correlated with breast cancer resistance to tamoxifen. *Oncol Lett.* 2013;6(1):118-24.
546. Deng L, Zheng W, Dong X, Liu J, Zhu C, Lu D, et al. Chemokine receptor CXCR7 is an independent prognostic biomarker in glioblastoma. *Cancer Biomark.* 2017;20(1):1-6.
547. Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, Lokeshwar SD, Gomez CS, Benitez A, et al. CXCR7: A Functionally Associated Molecular Marker for Bladder Cancer. *Cancer.* 2013;119(1):61-71.
548. Shi A, Dong L, Shi H, Jia M, Guo X, Jiang J, et al. [Expression of chemokine receptor CXCR7 in gastric cancer tissues and cell lines]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014;34(12):1780-4.
549. Engel J, Eckel R, Schubert-Fritschle G, Kerr J, Kuhn W, Diebold J, et al. Moderate progress for ovarian cancer in the last 20 years: prolongation of survival, but no improvement in the cure rate. *Eur J Cancer.* 2002;38(18):2435-45.
550. Murphy LC, Peng B, Lewis A, Davie JR, Leygue E, Kemp A, et al. Inducible upregulation of oestrogen receptor-beta1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells. *Journal of molecular endocrinology.* 2005;34(2):553-66.
551. Mendoza N, Moron FJ, Quereda F, Vazquez F, Rivero MC, Martinez-Astorquiza T, et al. A digenic combination of polymorphisms within ESR1 and ESR2 genes are associated with age at menarche in the Spanish population. *Reprod Sci.* 2008;15(3):305-11.
552. Mendoza N, Sanchez-Borrego R, Galiano D, Salamanca A, Mozas J, Quereda F, et al. Multigenic combination of estrogen-related genes is associated with age at natural menopause in a Spanish population. *Menopause Int.* 2009;15(4):150-6.
553. Fekete T, Raso E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkacsy G, et al. Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. *Int J Cancer.* 2012;131(1):95-105.