

Université de Montréal

Rôle de l'acide aminé 351 du récepteur des
oestrogènes α dans la modulation de l'activité
agoniste des anti-oestrogènes

par

Ioana Silvia Anghel

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études
supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

Avril 2000

© Ioana Silvia Anghel, 2000



W
4
U58
2000
V.033



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Rôle de l'acide aminé 351 du récepteur des oestrogènes α dans la modulation de
l'activité agoniste des anti-oestrogènes

présenté par
Ioana Silvia Anghel

est évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur: Dr. Muriel Aubry
Membres: Dr. Gilles Bleau
Dr. Sylvie Mader

Sommaire

L'activité antagoniste des anti-oestrogènes est due à la présence d'une chaîne latérale en position 7α ou en position 11β de leur squelette stéroïdien ou "steroid-like". Cette chaîne latérale établit des contacts hydrophobes avec des acides aminés se trouvant dans le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur des oestrogènes α (ER α). De plus, un lien hydrogène formé entre l'acide aminé D351 et l'amine tertiaire présente à la fin de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels, comme le tamoxifène (Tam), est considéré crucial pour l'activité anti-oestrogénique de ces derniers.

Le but de mon projet de maîtrise a été d'étudier le rôle de l'acide aminé D351 dans l'activité antagoniste des anti-oestrogènes partiels. Mes résultats indiquent que la perte de la charge négative en position 351 n'augmente pas l'activité agoniste des anti-oestrogènes partiels, le lien hydrogène n'est donc pas important dans le positionnement de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels dans une conformation antagoniste. La charge négative en position 351 n'est pas nécessaire à l'activité transcriptionnelle en présence d'hormone mais elle est cependant nécessaire à l'activité basale du récepteur sauvage ainsi que des mutants constitutifs L536P et Y537A. Ces résultats suggèrent un rôle de l'acide aminés D351 dans la stabilité d'une conformation active du récepteur. Cette stabilité serait due à l'interaction entre D351 et le groupe amide du lien péptidique entre les acides aminés L539/L540 de l'hélice 12. Cette interaction est observée dans la conformation active du LBD du ER α . La perte de cette interaction par la liaison des antiestrogènes partiels pourrait contribuer à l'activité antagoniste des anti-oestrogènes partiels.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	x
REMERCIEMENTS	xiii
CHAPITRE I – INTRODUCTION	1
1 Cancer du sein	2
1.1 Epidémiologie	2
1.2 Facteurs de risque	2
1.2.1 Les facteurs familiaux	3
1.2.2 Caractéristiques hormonales	3
1.2.3 Autres facteurs de risque	3
1.3 Types de tumeurs mammaires	4
1.4 Rôle des oestrogènes et du récepteur des oestrogènes au niveau des tissus mammaires, utérins, osseux et cardiovasculaires	5
1.5 Traitement du cancer du sein	5
1.5.1 Les anti-oestrogènes	6
1.6 Modèle pour le développement d’une résistance au tamoxifène lors du traitement du cancer du sein	8
1.6.1 Activation métabolique du tamoxifène	8
1.6.2 Changements de l’activité du récepteur des oestrogènes	10

2 Récepteurs des oestrogènes	10
2.1 Récepteurs des oestrogènes: modèle d'activité et structure générale	10
2.2 Rôle et propriétés fonctionnelles de ER α et ER β	15
2.3 Liaison du récepteur des oestrogènes à l'ADN	20
2.4 Liaison au ligand et dimérisation	22
2.5 Fonctions de transactivation AF1 et AF2	25
2.6 Modèles d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des oestrogènes	29
2.6.1 Facteurs de croissance et phosphorylation	29
2.6.2 Interférence entre ER et d'autres facteurs de transcription	31
2.6.3 Complexe de pré-initiation	32
2.6.4 Les cofacteurs	32
2.6.5 Structure de la chromatine	35
2.7 Mutations dans le récepteur des oestrogènes affectant l'activité des anti-oestrogènes	37
3 Buts principaux du projet de recherche	39
CHAPITRE II –ARTICLE	41
<i>Silvia Anghel, Véronique Perly, Geneviève Melançon, Annie Barsalou, Samuel Chagnon, Angelika Rosenauer, Wilson H. Miller, Sylvie Mader, (2000) Aspartate 351 of estrogen receptor alpha is not crucial for the antagonist activity of antiestrogens, sera publié au mois de juillet/ août 2000 dans le J. Biol. Chem</i>	
CHAPITRE III –DISCUSSION ET PERSPECTIVES	73
1-La mutation en position 351 ne change pas l'affinité relative du récepteur des oestrogènes pour les anti-oestrogènes	75
2- L'élimination de la charge négative en position 351 n'augmente pas l'effet agoniste des anti-oestrogènes	75
3- L'élimination de la charge négative en position 351 déstabilise la conformation active du récepteur des oestrogènes en absence d'hormone	76
4- Hypothèse	77

5-Perspectives 78

BIBLIOGRAPHIE 80

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I – INTRODUCTION

Figure 1. Oestrogènes et anti-oestrogènes.	9
Figure 2. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires.	12
Figure 3. Représentation schématique du ER α humain.	14
Figure 4. Comparaison et pourcentage de similitude entre les séquences protéiques de ER α et ER β de rat.	17
Figure 5. Différentes voies de signalisation possibles pour le complexe ER-oestrogène.	19
Figure 6. Structures tridimensionnelles du LBD du ER α en présence de oestradiol et raloxifène.	24
Figure 7. Présentation schématique des interactions existant entre le LBD du ER α et l'oestradiol ou le raloxifène.	26

CHAPITRE II – ARTICLE

Figure 1. Expression of ER α mutants at position 351.	51
Figure 2. Mutations that suppress the negative charge at position 351 reduce basal activity of the ER without estradiol-induced transcription.	52
Figure 3. Mutations that suppress the negative charge at position 351 do not affect <i>in vitro</i> recruitment of TIF2 in the presence of estradiol.	54
Figure 4. TIF2 overexpression does not increase transcriptional activity of hydrophobic mutants of D351 in HeLa cells treated with OHT.	55
Figure 5. Transcriptional activity of ER mutants carrying hydrophobic mutations of D351 is low in MDA-MB-231 cells treated with OHT.	58

Figure 6. Effect of mutations of D351 on estrogen and antiestrogen binding by ER α .	59
Figure 7. Effect of mutations of D351 on the DNA binding properties of ER α .	61
Figure 8. Suppression of basal activity by mutations of D351 is due to destabilization of the active conformation of unliganded ER α .	62

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1- INTRODUCTION

Tableau 1. Exemples de protéines pouvant interagir de manière dépendante du ligand avec les récepteurs nucléaires.	36
--	----

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A:	Alanine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF1:	Fonction d'activation 1
AF2:	Fonction d'activation 2
AIB 1:	Amplified in breast cancer 1
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
AP1:	Activating protein 1
AR:	Récepteur des androgènes
ARNm:	Acide ribonucléique messager
BRCA-1:	Breast cancer gene-1
BRCA-2:	Breast cancer gene-2
CEF:	Chicken fibroblasts
CHO:	Chinese hamster ovary cells
CK:	Caséine kinase
COS-1:	Green african monkey fibroblasts, ER-
CREB:	cAMP response element binding protein
D:	Acide aspartique
DES:	Diéthylstilbestrol
DBD:	Domaine de liaison à l'ADN
DCC:	"Dextran-coated charcoal"
E:	Acide glutamique
E ₂ :	17β-oestradiol
EGF:	Epidermal growth factor
ER α et β:	Récepteur des oestrogènes α et β
ER +:	Tumeurs (lignée cellulaire) exprimant le récepteur des oestrogènes

ER-:	Tumeurs (lignée cellulaire) ayant un niveau non détectable du récepteur des oestrogènes
ERE:	Élément de réponse aux oestrogènes
α ERKO:	Souris knock-out ER α
β ERKO:	Souris knock-out ER β
G:	Glycine
GR:	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE:	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GRIP1:	Glucocorticoid receptor-interacting protein 1
HAT:	Histone acétyltransférase
HeLa:	Human cervix adenocarcinoma, ER-
HRE:	Élément de réponse aux hormones
IGF-1:	Insuline-like growth factor-1
Kd:	Constante de dissociation
L:	Leucine
LBD:	Domaine de liaison du ligand
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCF-7:	Human mammary gland adenocarcinoma, ER+
MDA-MB-231:	Human mammary gland adenocarcinoma, ER-
MM:	Masse moléculaire
NCoR:	Nuclear receptor corepressor
OHT, 4-OHT:	4-hydroxytamoxifène
P:	Proline
PKA:	Protéine kinase A
PKC:	Protéine kinase C
PR:	Récepteur de la progestérone
PRE:	Élément de réponse à la progestérone
Ral:	Raloxifène
RAR:	Récepteur de l'acide "all-trans rétinoïque"
RT-PCR:	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RXR:	Récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque

SERMs:	Selective estrogen receptors modulators
SDG:	Centrifugation sur gradient de sucrose
SMRT:	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors
SRC-1:	Steroid receptor coactivator-1
SRC-2:	Steroid receptor coactivator-2
T:	Thréonine
TAFs:	TBP-associated factors
Tam:	Tamoxifène
TBP:	TATA-binding protein
TF II A:	Transcription factor II A
TF II B:	Transcription factor II B
TF II D:	Transcription factor II D
TGF- α :	Transforming growth factor- α
TIF2:	Transcription intermediary factor2
TR:	Récepteur de l'hormone thyroïdienne
V:	Valine
VDR:	Récepteur de la vitamine D ₃
Y:	Tyrosine
Zn:	Zinc

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Dr. Sylvie Mader de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Sa rigueur et son enthousiasme scientifique ainsi que ses conseils judicieux m'ont appris à développer et à améliorer la qualité de ma démarche scientifique ainsi que mes travaux.

Merci aussi à toutes les personnes avec qui j'ai travaillé de près ou de loin, spécialement Annie, Denis et Etienne pour leurs encouragements, Samuel pour les nombreuses constructions, et Julie pour son aide et son sourire.

Un grand merci à Véronique pour avoir supporté toutes mes sautes d'humeur, de m'avoir encouragé dans la poursuite de mes études et d'avoir pris le temps de lire et corriger mon mémoire.

Merci également à mes amis qui m'ont supporté et ont su m'encourager lorsque j'en avais besoin, plus particulièrement Anne-Marie, Chanterelle et Nicolas.

CHAPITRE I-INTRODUCTION

1 Cancer du sein

1.1 Epidémiologie

Le cancer du sein est de loin le cancer le plus fréquent chez la femme et son incidence ne cesse d'augmenter. Le cancer du sein représente 50% des cancers de la femme avant 50 ans et 20% des cancers de la femme après 75 ans. Une femme sur neuf développe un cancer du sein au cours de sa vie (Bachmann-Moisson *et al.*,1997).

L'implication des oestrogènes dans le cancer du sein est connue depuis des années. Il y a un siècle on pratiquait l'ovariectomie comme traitement efficace contre les tumeurs mammaires (Beatson *et al.*, 1896). De nos jours, l'hormonothérapie est un outil thérapeutique puissant s'ajoutant au traitement chirurgical, à la chimiothérapie et à la radiothérapie. L'isolation et l'identification du récepteur des oestrogènes dans les années 80 a permis le développement d'une série d'anti-oestrogènes tel le tamoxifène. Le traitement par le tamoxifène diminue les risques de mortalité d'environ 25% et diminue le risque de cancer du sein contralatéral de 39% (Tonetti *et al.*,1997). Malheureusement, la plupart du temps ces tumeurs vont finir par ne plus répondre au traitement par le tamoxifène. Certaines tumeurs deviennent même stimulées par le tamoxifène. Il est donc primordial d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'action des anti-oestrogènes ainsi que sur les mécanismes d'échappement à leur action anti-proliférative sur l'épithélium mammaire.

1.2 Facteurs de risque

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle. Malgré l'identification d'une série de facteurs capables d'induire le cancer du sein, toutes les femmes sont susceptibles d'avoir un jour cette maladie. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'augmentation de l'incidence du cancer du sein dans les populations occidentales dont des facteurs familiaux et les caractéristiques hormonales.

1.2.1 Les facteurs familiaux

Le risque relatif est multiplié par un facteur de deux à trois pour une femme ayant une parenté au premier degré ayant un cancer du sein. Des gènes dont la mutation prédispose au cancer du sein ont été identifiés. Les femmes ayant une mutation du gène BRCA-1 ou du gène BRCA-2 (mutation plus rare, présente aussi chez l'homme) ont un risque de 85% de développer un cancer mammaire. (Bachmann-Moisson *et al.*,1997). Il convient cependant de noter que les cancers du sein héréditaires ne représentent que 5% des cas (Hall *et al.*, 1990).

1.2.2 Caractéristiques hormonales

Une hyperoestrogénie liée à une insuffisance lutéale pourrait favoriser la tumorigenèse mammaire par le biais d'une prolifération cellulaire induite par des facteurs tels que la puberté précoce, l'absence d'allaitement, les cycles anovulatoires, une première grossesse tardive ou une ménopause tardive (Bachmann-Moisson *et al.*,1997).

1.2.3 Autres facteurs de risque

Il a été observé qu'une mauvaise alimentation et la diminution de l'exercice physique amenant une augmentation de poids et de la masse adipeuse peuvent augmenter le risque de développer une tumeur mammaire (Mori, 1998).

De la même manière, les facteurs environnementaux comme les radiations, le climat, ou les pesticides ont souvent été mis en cause, sans preuves concluantes toutefois (Mori, 1998, Messina *et al.*, 2000).

1.3 Types de tumeurs mammaires

Les cancers du sein sont classés en deux groupes: les tumeurs exprimant le ER (ER+) et celles ayant un niveau non détectable de ce récepteur (ER-). L'expression du ER dans les tumeurs mammaires est nécessaire à la réponse des cellules malignes au traitement hormonal. Le niveau de ER dans les tumeurs est donc mesuré par immuno-histochimie avant le début de la thérapie hormonale (Tominga *et al.*, 1981). Les tumeurs ER+ représentent 70 à 80% des tumeurs mammaires. De ces tumeurs ER+, 60% répondent à la thérapie hormonale contre seulement 10% des tumeurs ER- (Iwase *et al.*, 1998). Le traitement par les anti-oestrogènes tel le tamoxifène montre la plupart du temps de bons résultats cliniques. Il y a cependant un problème auquel les médecins doivent faire face: la résistance au traitement par les anti-oestrogènes. Les tumeurs évoluent au cours du traitement d'une croissance hormono-dépendante à une prolifération en absence d'hormones (hormono-indépendante). De plus, certaines tumeurs deviennent paradoxalement stimulées par le tamoxifène (Ogata,1998). Les mécanismes à la base de l'acquisition de cette indépendance vis à vis de l'oestrogène et de l'acquisition d'une stimulation par les anti-oestrogènes ne sont pas encore élucidés. On pense que ces phénomènes sont reliés à l'apparition de mutations ponctuelles affectant des oncogènes, anti-oncogènes ou d'autres gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire. L'amplification du gène c-erb-B2, codant pour un récepteur transmembranaire tyrosine kinase de la famille du récepteur du facteur de croissance EGF, ou une surexpression de cette protéine sont détectées fréquemment dans les tumeurs du sein (Ross *et al.*, 1999). La présence de c-erb-B2 corrèle avec des tumeurs plus agressives et une résistance aux anti-oestrogènes (Bezwoda, 2000). Ces mutations confèreraient aux cellules mutées des avantages sélectifs tels qu'une prolifération accrue ou l'acquisition de caractéristiques métastatiques.

1.4 Rôle des oestrogènes et du récepteur des oestrogènes au niveau des tissus mammaires, utérins, osseux et cardiovasculaires

Le premier indice suggérant que les tumeurs mammaires dépendent des oestrogènes pour leur croissance a été fourni par l'observation que l'ovariectomie peut causer la réduction d'une tumeur mammaire chez la femme (Beatson *et al.*, 1896). Parmi les facteurs responsables du développement et de la croissance du cancer du sein, les oestrogènes jouent donc un rôle prédominant. Autant la prolifération que la survie des tumeurs nécessitent la présence d'oestrogènes (Ogata, 1998). Afin d'exercer leur action, les oestrogènes doivent se lier leurs récepteurs (ER). La liaison du complexe oestrogène-ER à des sites spécifiques du génome de la cellule cible déclenche les mécanismes conduisant à la division cellulaire (Iwase *et al.*, 1998). Avant la ménopause, les oestrogènes proviennent de deux sources, les ovaires et les surrénales, la source principale étant les ovaires. Après la ménopause, les niveaux d'oestrogène circulant chutent fortement, les oestrogènes étant produits principalement par la conversion des androgènes en oestrogène par les aromatasés dans les sites périphériques tel le tissu adipeux (Makin, 1984). La réduction de la production d'oestrogène après la ménopause est associée à une diminution de l'incidence du cancer du sein dans cette tranche d'âge. Toutefois, la supplémentation oestrogénique recommandée pour contrer l'ostéoporose peut conduire à une augmentation des risques de cancer du sein.

L'invalidation (le knock-out) du ER chez la souris montre l'importance de l'oestrogène ainsi que de son récepteur dans le développement des glandes mammaires et du système reproducteur, au bon fonctionnement du système neuroendocrinien, au maintien et à l'augmentation de la masse osseuse ainsi qu'au maintien d'un taux sanguin faible de cholestérol.

1.5 Traitement du cancer du sein

Il existe actuellement deux voies d'action pour empêcher l'effet des oestrogènes au niveau des tissus mammaires. On peut empêcher la synthèse des oestrogènes en utilisant différents inhibiteurs de leur voie de synthèse (inhibiteurs de l'enzyme aromatasé). L'action

des oestrogènes sur leurs cellules cibles peut aussi être bloquée par l'utilisation de composés analogues aux oestrogènes mais dépourvus d'effets oestrogéniques. Ces composés portent le nom d'anti-oestrogènes.

1.5.1 Les anti-oestrogènes

Les anti-oestrogènes peuvent être classifiés en deux groupes majeurs. Le type I qui comprend les anti-oestrogènes à effet agoniste partiel (appelés aussi SERMs) et le type II qui comprend les anti-oestrogènes purs (totaux; figure 1).

a) Les anti-oestrogènes de type I

Les anti-oestrogènes de type I sont aussi appelés SERMs (*Selective Estrogen Receptors Modulators*). Ce sont des molécules qui se lient aux récepteurs des oestrogènes et induisent une réponse cellulaire soit de type agoniste, soit de type antagoniste, en fonction du tissu sur lequel ils agissent. Plusieurs SERMs sont en cours de développement clinique avec pour objectif d'obtenir un effet agoniste de ces molécules sur le tissu osseux et le système cardiovasculaire et un effet antagoniste au niveau du sein et de l'endomètre (Fontana *et al.*, 1999).

Les anti-oestrogènes de type I sont divisés en deux catégories en fonction de leur structure. Ainsi, il y a les anti-oestrogènes de type I stéroïdiens comme le RU 39 411 et les anti-oestrogènes de type non-stéroïdiens comme le tamoxifène (Tam) et le raloxifène (Ral, figure 1).

Le tamoxifène, anti-oestrogène utilisé actuellement dans le traitement du cancer du sein, est à l'origine du concept des SERMs. Il est composé d'une structure triphényléthylène et son métabolite actif est le 4-hydroxytamoxifène (figure 1). Ce composé est utilisé dans le traitement du cancer du sein ER+ chez les femmes ménopausées. L'effet anti-oestrogénique du Tam permet de contrôler la croissance des cellules cancéreuses mammaires. De plus, il a un effet bénéfique au niveau de la masse osseuse, par inhibition de la dégradation osseuse (Stewart *et al.*, 1986). Le même effet bénéfique a été observé au niveau du taux de

cholestérol sanguin. L'administration de Tam entraîne une baisse de la concentration de cholestérol total d'environ 13% (Saarto *et al.*, 1996). Par contre, les données cliniques indiquent que l'administration de fortes doses de Tam à long terme peut stimuler des carcinomes de l'endomètre (Gottardis *et al.*, 1988).

Le torémifène (le chlorotamoxifène) est un analogue du tamoxifène. Ce composé, moins puissant que le tamoxifène, est également un anti-oestrogène utilisé comme agent antitumoral dans le traitement adjuvant des tumeurs mammaires (Kangas *et al.*, 1986). L'idoxifène est un autre analogue du tamoxifène; ce composé possède des propriétés anti-oestrogéniques et antitumorales dans certains modèles expérimentaux (Chander *et al.*, 1991). Le droloxifène, ou 3-hydrotamoxifène, démontre une bonne activité antitumorale sur des modèles de laboratoire (Lose *et al.*, 1985).

Le LY 117 018 et le raloxifène sont d'autres composés du type I mais ils n'ont pas la même structure que le Tam. Ils ont une grande affinité pour le ER mais un plus faible effet oestrogénique (comparé à celui du Tam) au niveau de l'utérus chez les rongeurs. Ils ont aussi un effet bénéfique au niveau de la masse osseuse (Jordan *et al.*, 1983; Grese *et al.*, 1997). Ces anti-oestrogènes sont donc dépourvus des effets mitogéniques du E₂ dans les tissus reproductifs tout en gardant un effet oestrogénique dans les autres tissus.

Du point de vue structural, le point commun entre les anti-oestrogènes de type I (Ral, Tam et RU 39 411) est un groupe amine tertiaire qui se trouve dans la chaîne latérale, en position similaire chez les trois composés. Ce groupement électrophile n'est pas retrouvé dans la chaîne latérale des anti-oestrogènes totaux. Il est possible que ce groupe amine tertiaire soit responsable de la réponse pharmacologique des anti-oestrogènes de type I.

b) Les anti-oestrogènes de type II

Les anti-oestrogènes de type II ne sont utilisés qu'en cas d'échec au traitement avec les SERMs. Ils bloquent l'activité du ER dans tous les tissus et n'ont donc pas les effets bénéfiques des SERM dans certains tissus comme le tissu osseux et le système cardiovasculaire.

Le premier composé de ce type a été le ICI 164 384 (Wakeling et Bowler, 1988). Le ICI 182 780 est plus efficace que le ICI 164 384 et a été proposé comme traitement du cancer du sein après échec du traitement par le Tam. L'inconvénient de ces composés est qu'ils ne sont pas hydrosolubles et ne peuvent pas être administrés oralement.

Le RU 58 668 est substitué en position β sur le carbone C-11 par une longue chaîne latérale hydrophobe identique dans les deux composés ICI 164 384 et ICI 182 780 (Van de Velde *et al.*, 1996).

Tous ces anti-oestrogènes totaux sont caractérisés par un squelette stéroïdien et une longue chaîne latérale d'au moins 5 carbones en C-11 β ou en C-7 α . De plus, et contrairement aux anti-oestrogènes de type I, les anti-oestrogènes de type II ont des groupements sulfoxide ou sulfonyle au lieu du groupement électrophile amine tertiaire.

1.6 Modèle pour le développement d'une résistance au tamoxifène lors du traitement du cancer du sein

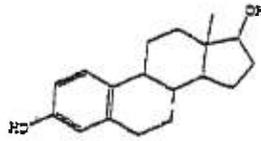
Une résistance au Tam ou même une stimulation par le Tam peut survenir lors de traitements à long terme. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène qui peut être reproduit dans des modèles animaux. Cette résistance des tumeurs ER+ peut se produire suite à différents changements qui peuvent survenir dans la cellule cancéreuse. Il peut s'agir de changements dans le métabolisme du Tam ou dans l'activité du ER induite par des molécules signalisatrices (MacGregor et Jordan, 1998).

1.6.1 Activation métabolique du tamoxifène

Le Tam peut être métabolisé en deux métabolites principaux: le 4-hydroxytamoxifène et le N-desméthyltamoxifène. Le 4-OHT, un métabolite produit en petite quantité, est un très puissant anti-oestrogène qui lie le ER avec la même affinité que l'E₂. Il faut cependant mentionner que ce métabolite n'est pas très stable: il s'isomériser facilement en une forme *cis* moins active. Le N-desméthyltamoxifène est le métabolite majeur du Tam mais est beaucoup moins efficace que le tamoxifène. Le Tam peut être aussi

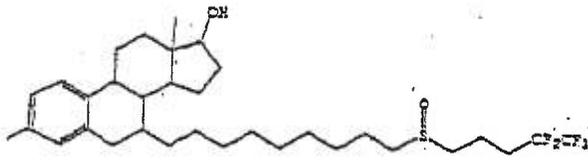
Figure 1. **Oestrogène et anti-oestrogènes.** Le 17 β -oestradiol est le ligand naturel du ER. Les deux anti-oestrogènes totaux illustrés sont stéroïdiens. Les anti-oestrogènes partiels regroupent des composés stéroïdiens et non-stéroïdiens.

Oestrogène

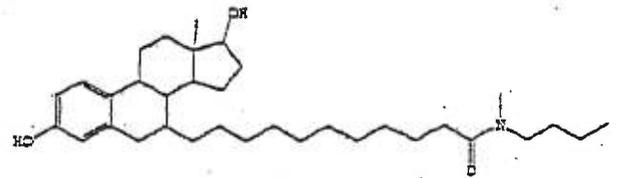


17- β -oestradiol

Anti-oestrogènes totaux



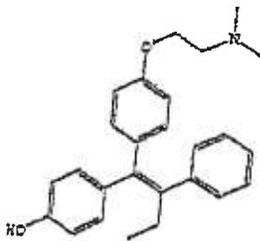
ICI 182, 780



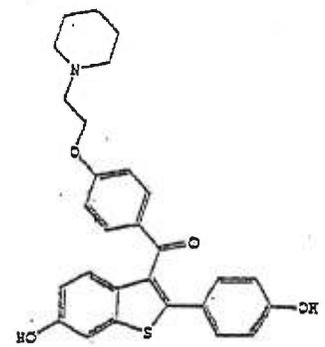
ICI 164, 384

Anti-oestrogènes partiels

Non-stéroïdiens

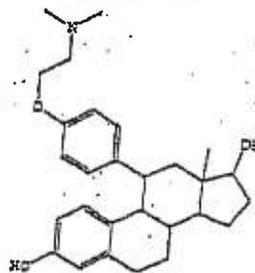


4-hydroxytamoxifène



raloxifène

Stéroïdien



RU 39,411

converti en deux autres métabolites: le Met E et le bisphénol, qui ont un effet oestrogénique.

Plusieurs groupes de recherche ont suggéré que l'accumulation intratumorale de métabolites du Tam qui sont soit des anti-oestrogènes moins puissants, soit des agonistes, pourrait conduire à une résistance au Tam (Osborne *et al.*, 1991; Johnston *et al.*, 1993). L'équipe de De Gregorio a trouvé dans certaines tumeurs stimulées par le Tam un taux de Tam intratumoral inférieur à celui présent dans les tumeurs inhibées par le Tam. De plus, le niveau de Met E est supérieur dans les tumeurs stimulées par Tam (Osborne *et al.*, 1991). Par contre, l'équipe de Jordan n'a pas réussi à détecter de différences significatives dans la concentration de Tam intratumorale entre les deux types de tumeurs (Wolf *et al.*, 1994).

1.6.2 Changements de l'activité du récepteur des oestrogènes

L'équipe de Katzenellenbogen a démontré que l'activation de la voie de la PKA augmente l'activité agoniste du complexe ER-Tam en présence d'un gène rapporteur contenant deux ERE (ERE₂, élément de réponse aux oestrogènes). En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de AMP_c ou la transfection d'un vecteur d'expression qui contient la sous-unité catalytique de PKA augmente de 20 à 75% l'activité transcriptionnelle en présence de Tam (Fujimoto et Katzenellenbogen, 1994).

2 Récepteurs des oestrogènes

2.1 Récepteurs des oestrogènes: modèle d'activité et structure générale

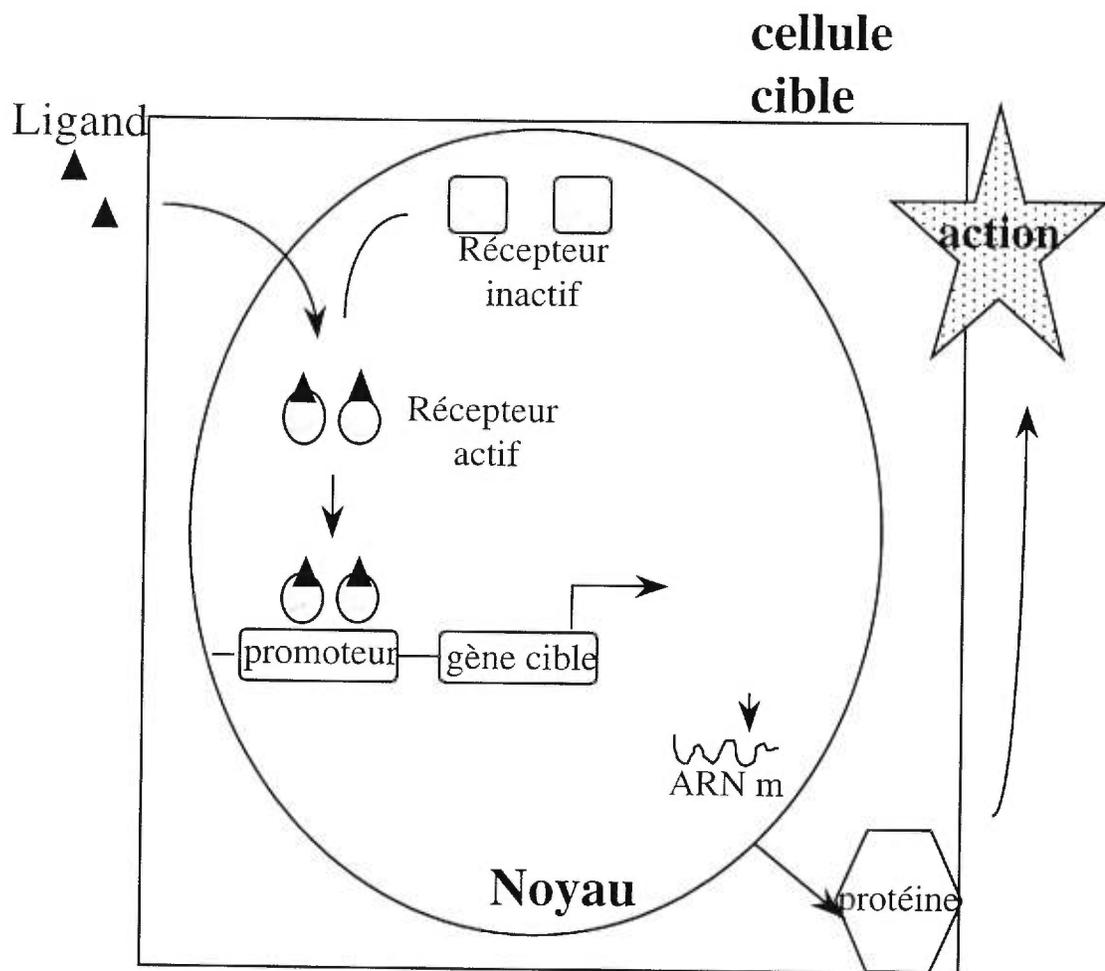
Les récepteurs des oestrogènes α et β (ER α , ER β) font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires qui comprend aussi les récepteurs de l'hormone thyroïdienne (TR), de la vitamine D₃ (VDR), des acides all-trans et 9-cis rétinoïques (RAR/RXR), de la progestérone (PR), des glucocorticoïdes (GR), des androgènes (AR) et de l'ecdysone (Bachmann-Moisson *et al.*, 1997; Evans, 1988; Kato *et al.*, 1998). Le premier récepteur nucléaire cloné et séquencé a été le GR (Hollenber *et al.*, 1985), suivi du ER α en 1985-86

(Walter *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986). Depuis, d'autres récepteurs de la même famille ont été clonés et séquencés (Krust *et al.*, 1986; Koike *et al.*, 1987; White *et al.*, 1987; Evans, 1988; Pakdel *et al.*, 1989).

Les hormones stéroïdiennes, petites molécules hydrophobes synthétisées par les surrénales et les gonades, se dirigent, en passant par le flot sanguin, vers leurs cellules cibles. Elles rentrent alors dans ces cellules par diffusion et se lient à leurs récepteurs spécifiques (Rao, 1981). Ces récepteurs agissent comme facteurs de transcription inductibles en présence de ligand (Kato S *et al.*, 1998). En absence de ligand, le ER est dans un état inactivé, lié à une protéine de choc thermique hsp90 ainsi qu'à d'autres protéines de choc thermique et aux immunophilines. L'oestradiol, après avoir pénétré dans la cellule cible, va pouvoir se lier au ER localisé dans le noyau. Une fois lié à l'oestradiol, le ER se dissocie des protéines de choc thermique et "s'active" par formation d'homo/hétérodimères ($ER\alpha/ER\alpha$, $ER\alpha/ER\beta$, $ER\beta/ER\beta$) qui vont pouvoir se lier à des séquences spécifiques d'ADN appelées *estrogen response elements* (ERE, éléments de réponse aux oestrogènes, Ogawa *et al.*, 1998). La dissociation du complexe avec le hsp 90 induite par le ligand permettrait au récepteur de passer d'une forme inactive pour sa liaison au ERE à une forme active (Bagchi *et al.*, 1988; Beekman *et al.*, 1993; Denis *et al.*, 1988). Les séquences ERE sont principalement localisées dans les séquences promotrices de gènes dont la transcription est sous le contrôle des oestrogènes (Bachmann-Moisson N *et al.*, 1997). La production histo-spécifique de ces protéines permet à la cellule cible d'effectuer une réponse cellulaire suite à la stimulation par l'oestrogène (figure 2). En plus de moduler la transcription, les hormones stéroïdiennes peuvent aussi agir au niveau de la stabilité de l'ARNm ainsi que de sa traduction par des mécanismes encore mal connus.

Comme tous les facteurs de transcription, le ER contient des domaines de liaison à l'ADN et d'activation transcriptionnelle. Ces domaines correspondent à des zones d'homologie, définies dans la superfamille des récepteurs nucléaires par comparaison des différents membres de cette famille et par comparaison entre espèces du même récepteur. On distingue six régions d'homologie distinctes, de A à F (Murphy *et al.*, 1997, figure 3).

Figure 2. **Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires.** Les hormones se dirigent par le biais de la circulation sanguine vers les cellules cibles où elles rentrent par diffusion simple ou facilitée. La liaison de l'hormone à son récepteur spécifique active ce dernier par dissociation du complexe avec hsp90. Lorsque le récepteur est activé, il peut se lier à des séquences d'ADN spécifiques appelées "*hormone response elements*". Ces séquences sont principalement localisées dans la région promotrice des gènes cibles. La liaison du récepteur activé à son élément de réponse induit la transcription de ces gènes et la synthèse des protéines responsables de la réponse cellulaire.



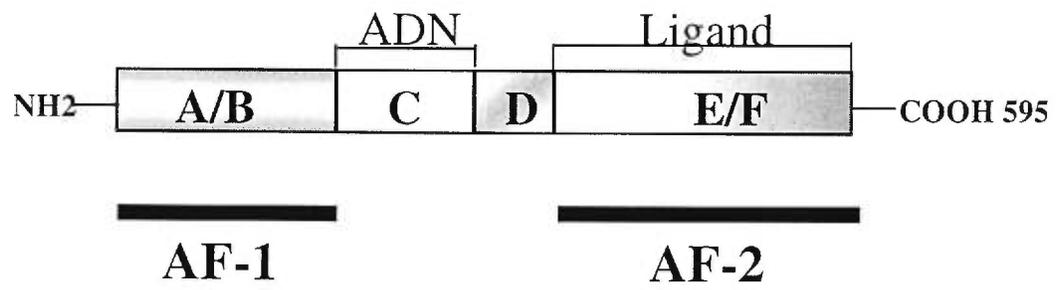
La région C, correspondant au *DNA-binding domain* (DBD, domaine de liaison à l'ADN, Mader *et al.*, 1993), contient deux doigts de zinc et est responsable de la liaison spécifique du récepteur à son élément de réponse. Il possède aussi une fonction de dimérisation constitutive mais faible en absence des autres domaines. Ce domaine est hautement conservé parmi tous les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens (Murphy *et al.*, 1997) .

La région A/B, qui n'est pas très conservée, contient une fonction de transactivation (AF1) active seulement dans certains contextes cellulaires et sur certains promoteurs. Cette fonction est indépendante du ligand lorsqu'isolée du reste du récepteur. Il se peut que cette fonction soit impliquée dans l'effet agoniste du tamoxifène. En effet, il a été démontré que dans des cellules telles que les cellules HeLa, CEF, MDA-MB-231, HEC-1 ou dans la levure sur certains promoteurs tels que ERE₃-pS2, ERE-TATA, il est possible d'observer une activité agoniste du tamoxifène qui se fait par l'intermédiaire de la fonction AF1. Les anti-oestrogènes totaux ne démontrent aucune activité oestrogénique dans ces cellules (Berry *et al.*, 1990, Mc Inerney *et al.*, 1996, Metzger *et al.*, 1995).

La région E contient le domaine de liaison du ligand (*ligand binding domain*; LBD), une fonction de dimérisation ainsi qu'une fonction de transactivation (AF2) dépendante de la liaison du ligand. Ce domaine est hautement conservé parmi les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens (Murphy *et al.*, 1997). Des mutants du ER ayant des mutations dans le LBD ont montré que certaines mutations influencent l'affinité de la liaison du ligand au LBD, la liaison du récepteur au ERE et la fonction de transactivation du récepteur (Danelian *et al.*, 1993; Pakdel et Katzenellenbogen, 1992; Mahfoudi *et al.*, 1995). L'activité transcriptionnelle du récepteur peut donc être abolie non seulement par des mutations affectant la fonction de transactivation mais également par des mutations ayant un effet sur l'affinité de la liaison au ligand ou sur la dimérisation .

La région D contient une série d'acides aminés basiques conservés dans tous les récepteurs des stéroïdes. Il est probable que ce domaine soit impliqué dans la localisation nucléaire du récepteur ainsi que dans la liaison à l'ADN (Murphy *et al.*, 1997).

Figure 3. **Représentation schématique du ER α humain.** Les régions A à F sont représentées ainsi que les fonctions d'activation transcriptionnelle AF1 et AF2.



Le domaine F semble être impliqué dans une fonction de modulation spécifique de la réponse transcriptionnelle en présence d'oestrogène et des anti-oestrogènes (Nichols *et al.*, 1998). Cette fonction serait influencée par le contexte cellulaire (Montano *et al.*, 1995). Ce domaine varie beaucoup d'un type de récepteur à l'autre.

Lors de l'activation du récepteur, les deux domaines essentiels sont contenus dans la région A/B (la fonction AF1) du côté N-terminal du récepteur et la région E (la fonction AF2) du côté C-terminal du récepteur. L'activité de ces deux fonctions varie en fonction du tissu et de l'espèce et leurs propriétés sont différentes.

2.2 Rôle et propriétés fonctionnelles de ER α et ER β

Le premier ER cloné a été le ER α en 1985-86 par le groupe de Chambon (Walter *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986). Le ER β a été cloné en 1995 par l'équipe de Gustafsson (Kuiper *et al.*, 1996) à partir d'une banque d'ADNc de prostate de rat. L'homologue humain a été identifié et caractérisé en 1996 par l'équipe de Dijkema (Mosselman *et al.*, 1996) et l'homologue de souris a été cloné en 1997 par l'équipe de Giguère (Tremblay *et al.*, 1997). Ce récepteur possède une grande similitude avec le ER α dans le domaine de liaison à l'ADN, le DBD (95.5%), et aussi dans le domaine de liaison du ligand, le LBD, (59.7%, voir figure 4). Le fait que ER α et ER β possèdent un DBD pratiquement identique (ils ne diffèrent que par un seul acide aminé) suggère que ER α et ER β peuvent interagir avec des ERE identiques (figure 4). Cependant, leurs domaines A/B ainsi que leurs fonctions d'activation AF1 sont très différentes, ce qui suggère que l'activation transcriptionnelle des gènes sous le contrôle des oestrogènes par ces deux récepteurs peut être différente (Katzenellenbogen et Korach, 1997). L'existence de deux types de ER élargit de beaucoup le potentiel de régulation physiologique par les oestrogènes. La réponse cellulaire suite à un traitement en présence d'un stimulus oestrogénique peut être différente selon la composition en ER de la cellule cible. Il est possible que la variation de la composition en ER des cellules cibles résulte en la formation de différents homo/hétérodimères. Cette différence pourrait induire une réponse cellulaire histo-spécifique et ce, non seulement pour les oestrogènes mais aussi pour les anti-oestrogènes.

ER β possède une affinité presque similaire à celle de ER α pour l'oestradiol et pour certains anti-oestrogènes: la constante de dissociation (Kd) pour l'oestradiol est de 0,5 nM pour mER β et de 0,2 nM pour mER α (Katzenellenbogen et Korach, 1997, Tremblay *et al.*, 1997). Cependant, la co-transfection dans les cellules CHO de ER et d'un promoteur sous le contrôle des oestrogènes (ERE) montre une stimulation de la transcription par l'oestrogène d'environ trois fois supérieure pour ER α comparé à l'activation observée avec ER β (Mosselman *et al.*, 1996). En présence de tamoxifène, de 4-hydroxytamoxifène ou de raloxifène, ER α possède une activité agoniste partielle tandis que ER β montre une activité antagoniste pure sur un promoteur contenant des éléments ERE (Barkhem *et al.*, 1998, Tremblay *et al.*, 1997). De plus, Tam démontre une activité agoniste partielle en présence de mER α sur un promoteur minimal ERE-TATA dans les cellules COS-1 mais cet effet n'est pas observé avec le mER β (Kuiper *et al.*, 1997). Aussi, l'affinité de l'homodimère ER β pour ERE est plus faible que dans le cas de l'homodimère ER α mais l'affinité de l'hétérodimère est comparable à celle de l'homodimère ER α (Tremblay *et al.*, 1997). Cette différence d'affinité pour ERE ainsi que leur fonction AF1 différente pourraient être responsables de l'activité agoniste partielle observée pour certains anti-oestrogènes.

ER peut aussi réguler la transcription à partir d'un promoteur ayant un élément AP1. Ce type de transactivation, appelé "voie alternative", implique une modulation de l'activité des facteurs de transcription Jun et Fos. Lorsque l'on co-transfecte ER α et un gène rapporteur sous le contrôle d'un élément AP1, on observe une stimulation de la transcription autant en présence d'oestrogènes qu'en présence d'anti-oestrogènes. Par contre, en présence de ER β , on observe une inhibition de la transcription en présence de l'oestrogène et une activation de la transcription en présence d'anti-oestrogènes ceci correspond à une pharmacologie inversée des ligands du ER. En présence de ER β -AP1, les anti-oestrogènes jouent un rôle d'activateurs transcriptionnels et l'oestrogène joue le rôle d'un inhibiteur de la transcription (Paech *et al.*, 1997).

ER α et ER β ont des localisations tissulaires différentes. Par la technique de RT-PCR ainsi que par la technique de protection contre la ribonucléase, il a été démontré chez le rat, la souris et l'humain qu'il y a une prédominance de ER α dans des tissus comme

Figure 4. **Comparaison et pourcentage de similitude entre les séquences protéiques de ER α et ER β de rat.** Les pourcentages d'identité au niveau des acides aminés des différentes régions sont inscrits dans la représentation schématique du rER. Des degrés de similitude sont retrouvés chez les récepteurs des oestrogènes chez la souris et l'humain.
Inspiré de Kuiper et Gustafsson (1997) *FEBS Lett.* **410**, 87-90

1	180	256	360		554	600					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center; border: 1px solid black;">A/B</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">C</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">D</td> <td style="width: 25%; text-align: center; border: 1px solid black;">E</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">F</td> </tr> </table>							A/B	C	D	E	F
A/B	C	D	E	F							

rER α

1	104	170	259		455	485					
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center; border: 1px solid black;">16.5</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">95.5</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">28.9</td> <td style="width: 25%; text-align: center; border: 1px solid black;">59.7</td> <td style="width: 10%; text-align: center; border: 1px solid black;">16.7</td> </tr> </table>							16.5	95.5	28.9	59.7	16.7
16.5	95.5	28.9	59.7	16.7							

rER β

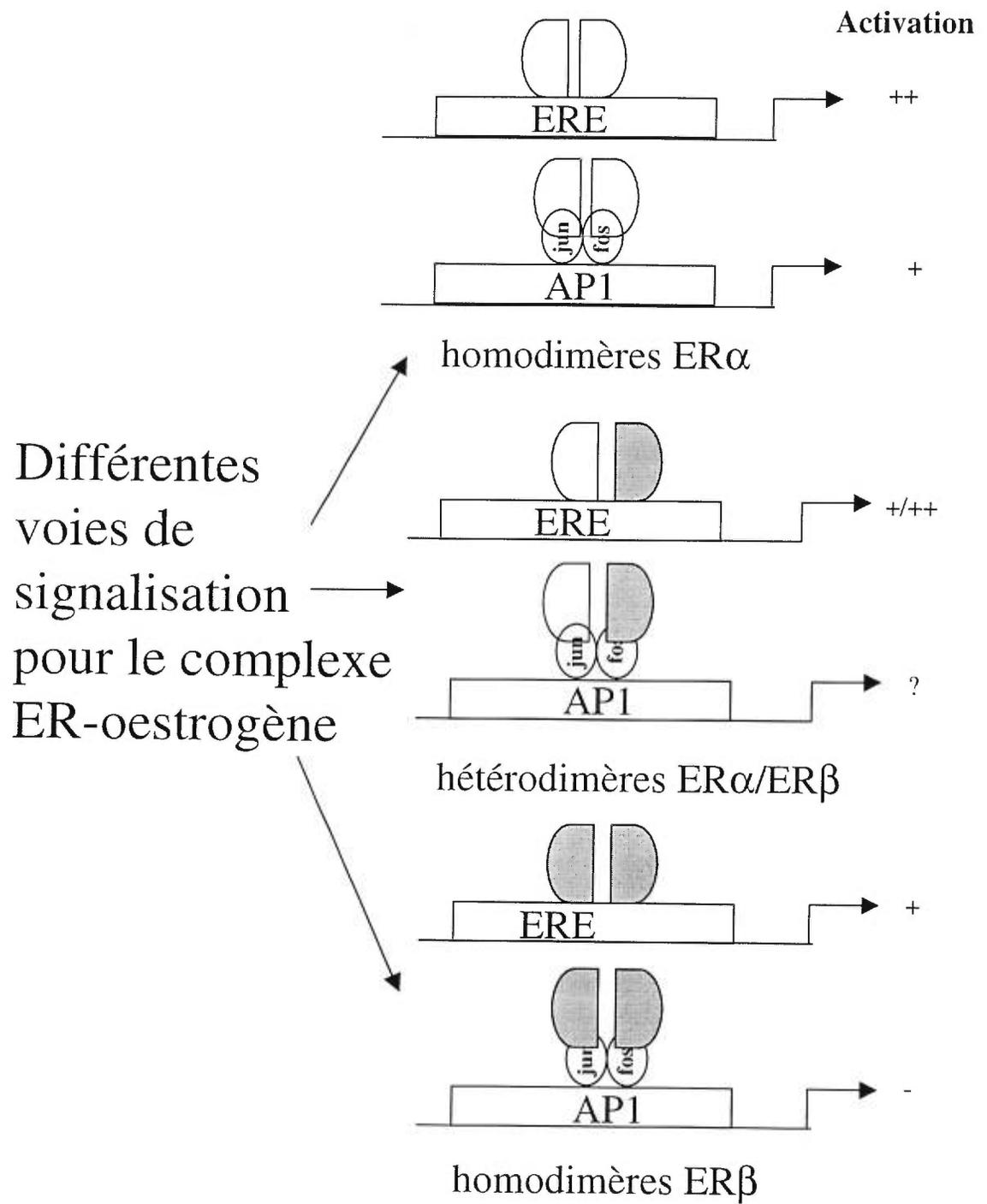
l'utérus, les glandes mammaires, les testicules, le foie, le coeur, les reins et les muscles squelettiques. Dans d'autres tissus, il y a l'expression de ER α et ER β à des niveaux comparables (l'épididyme, la thyroïde, les os, certaines régions du cerveau). Finalement, certains tissus expriment préférentiellement ER β (les ovaires, la prostate) (Katzenellenbogen et Korach, 1997, Couse et Korach, 1999).

La production de souris "knock-out" pour les gènes de ER α (α ERKO) et ER β (β ERKO) a permis une meilleure compréhension du rôle de ces récepteurs dans différents tissus et organes. Le knock-out des gènes codant pour ER α et ER β n'est pas létal mais influence à différents degrés la fertilité, le développement du système reproductif, le développement des glandes mammaires ainsi que les systèmes neuroendocrinien, cardiovasculaire et l'os, en plus d'affecter le comportement (Smith *et al.*, 1994, Couse et Korach, 1999).

Les souris α ERKO mâles et femelles sont stériles. Par contre, le knock-out du gène ER β n'affecte pas la fertilité du mâle alors que l'effet chez la femelle se traduit par une diminution de la taille des portées (Lubahn *et al.*, 1993). Le phénotype du α ERKO est important dans le cas du développement du système reproductif. Chez la femelle, il y a perte de l'action mitogénique de l'EGF et gain d'une activité mitogénique causée par les androgènes sur le système reproductif. Les ovaires se développent normalement chez les souris α ERKO mais l'ovulation est compromise; il y a apparition de kystes et augmentation de 30 à 40 % de l'incidence des tumeurs ovariennes (Lubahn *et al.*, 1993, Curtis *et al.*, 1996, Krege *et al.*, 1998). Chez le mâle α ERKO, il y a une diminution de la spermatogénèse et du poids des testicules ainsi qu'une augmentation de la taille des vésicules séminales (Krege *et al.*, 1998). Chez les souris β ERKO femelles, il y a diminution du nombre d'ovocytes; par contre, les souris mâles sont normales (Krege *et al.*, 1998). Seul le knock-out du gène ER α affecte le développement des glandes mammaires (Bocchinfuso *et al.*, 1997).

Le knock-out du gène ER α affecte le système neuroendocrinien autant chez les mâles que chez les femelles. Dans les deux cas, on observe une augmentation de la concentration sérique de l'oestradiol, de la testostérone et de la LH. Les concentrations en progestérone et FSH restent normales. Le knock-out du gène ER β n'affecte pas le système

Figure 5. **Différentes voies de signalisation possibles pour le complexe ER-oestrogène .**
La présence de deux types de récepteurs des oestrogènes ainsi que leur capacité à former des hétérodimères suggèrent l'existence de trois voies possibles d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des oestrogènes. En plus de l'interaction des homo/hétérodimères avec le ERE conventionnel, il existe d'autres interactions possibles entre les hétérodimères et d'autres éléments de réponse comme l'élément de réponse AP1.
Inspiré de Pettersson *et al.*, (1997) *Mol. Endo.*, **11**, 1486-1496



neuroendocrinien (Scully *et al.*, 1997, Lindzey *et al.*, 1998, Couse et Korack, 1999).

Le comportement des souris α ERKO est aussi affecté. Chez les femelles, il y a augmentation du taux d'infanticide et elles deviennent plus agressives tandis que les mâles deviennent moins agressifs. Au contraire, le knock-out du gène ER β n'affecte pas le comportement des souris (Krege *et al.*, 1998).

On observe aussi que le knock-out du gène ER α favorise une augmentation du taux sérique de l'apolipoprotéine E, ce qui augmente les risques de problèmes cardiaques et bloque la croissance des os longs (Pan *et al.*, 1997, Srivastava *et al.*, 1997).

En conclusion, les knock-out des gènes ER α et ER β démontrent l'implication des ces récepteurs dans l'action physiologique des oestrogènes au niveau du système reproductif, des os, du système cardiovasculaire et du comportement.

2.3 Liaison du récepteur des oestrogènes à l'ADN

La liaison spécifique à l'ADN par les facteurs de transcription constitue une étape majeure de la régulation génique. ER lie l'ADN sous forme d'homo/hétérodimères et reconnaît un élément de réponse palindromique de séquence consensus PuGGTCAnnnTGACCPy, le ERE. Cet élément palindromique est composé de 15 paires de bases divisées en deux "bras" de six paires espacés par trois paires de bases (Schwabe *et al.*, 1993; Green et Chambon, 1988). L'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) diffère de l'ERE par deux bases dans chaque bras (PuGAACA). L'espacement entre les deux bras est important pour la reconnaissance spécifique d'un élément de réponse par les récepteurs nucléaires.

La région C est responsable de l'activation spécifique des gènes cibles et coïncide avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Ceci a été démontré par l'utilisation de récepteurs chimériques. Un ER qui contient la région C du GR va se fixer sur l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) et ne fixe plus le ERE (Green et al., 1988). De plus, la région C isolée est suffisante pour reconnaître un ERE de manière spécifique (Mader *et al.*, 1993).

La région C comprend deux sous-domaines (CI et CII), chacun étant composé d'un motif doigt de Zn-hélice α . Le doigt de Zn contient un atome de Zn coordonné par quatre cystéines. Cette coordination des atomes de zinc est très importante pour l'intégrité structurale et la fonction de liaison à l'ADN du DBD (Freedman *et al.*, 1988). L'hélice α commence entre la troisième et la quatrième cystéine du doigt de Zn et se poursuit dans le cas du sous-domaine CII par la région étendue composée de 12 acides aminés (Schabwe *et al.*, 1993).

Même si les deux sous-domaines du domaine C sont nécessaires à la liaison à l'élément de réponse, c'est le domaine CI qui détermine la spécificité pour l'élément de réponse (Green *et al.*, 1988; Green et Chambon, 1988). CI établit des contacts spécifiques avec certaines bases de l'élément de réponse et ces interactions sont stabilisés par des contacts non-spécifiques réalisés par CI et CII. Une séquence de trois acides aminés en C-terminal du CI, appelés boîte P, joue un rôle important dans la spécificité de l'interaction ER-ERE par rapport à l'interaction avec un GRE (Mader *et al.*, 1989). La substitution des trois acides aminés de la boîte P du ER par ceux du GR change la spécificité du récepteur mutant qui reconnaît alors avec une haute affinité un GRE au lieu de l'ERE (Mader *et al.*, 1989). Au niveau du CII, une boucle formée par cinq acides aminés, appelée boîte D, est impliquée dans la dimérisation du récepteur. La boîte D est particulièrement importante pour la distinction entre palindromes et répétitions directes (Umesco et Evans, 1989). Les structures cristallines des DBD de ER et de GR complexés à l'ADN indiquent que les deux doigts de zinc CI et CII ont des fonctions bien distinctes (Schwabe *et al.*, 1993). Chacun des modules possède une hélice α qui, lorsque réunies, forment le coeur hydrophobe du DBD. Les boucles qui existent entre les deuxièmes et troisièmes cytosines de chaque module établissent des contacts non spécifiques avec l'ADN, positionnant ainsi le DBD de telle sorte que l'hélice α du CI puisse se placer dans le sillon majeur, perpendiculairement à l'axe de l'ADN. C'est l'hélice α du CI contenant la boîte P, qui établit les contacts spécifiques avec l'élément de réponse.

2.4 Liaison au ligand et dimérisation

La capacité d'activation du récepteur par un composé dépend de deux paramètres: l'affinité et l'efficacité de l'interaction récepteur/ligand. L'affinité est une mesure de l'aptitude du ligand à se lier à son récepteur. L'efficacité est la capacité du ligand, une fois lié, à initier des changements structuraux qui induiront l'activation du récepteur. Pour un agoniste, c'est-à-dire une molécule liant et activant le récepteur, l'efficacité est très élevée. Un antagoniste (anti-oestrogène total) se lie habituellement le même site par compétition, mais ne génère pas d'activation et a par conséquent une efficacité nulle. Finalement, un agoniste partiel (anti-oestrogène partiel) est un composé possédant des activités agonistes et antagonistes variables selon le contexte cellulaire ou le promoteur. Son efficacité est donc intermédiaire, les effets produits étant moindres que ceux produits par un agoniste (Rang *et al.*, 1995).

Tous les ligands du ER se lient exclusivement au domaine C-terminal du récepteur, la région E/F (LBD). Ce dernier reconnaît une grande variété de composés suivant des critères de taille, forme et propriétés chimiques. Certains de ces ligands comme les oestrogènes naturels et le diethylstilbestrol (DES) fonctionnent comme des agonistes purs. D'autres comme le ICI 182 780 fonctionnent comme antagonistes purs alors que les molécules comme le raloxifène (Ral) ou le tamoxifène (Tam) fonctionnent comme des antagonistes partiels en fonction du type et du contexte cellulaire (Grese *et al.*, 1997).

La structure des complexes formés entre le LBD du ER α et les agonistes (E₂ ou DES) ainsi que les antagonistes partiels (Ral ou Tam) a été déterminée par cristallographie.

L'arrangement homodimérique est le même pour les complexes ER-LBD-agoniste et ER-LBD-antagoniste partiel. Les homodimères sont arrangés dans une position "tête-à-tête" dans laquelle les chaînes C-terminales des deux monomères sont projetées vers l'axe de dimérisation. Les hélices H8 et H11 de chaque monomère s'alignent pour former une surface de dimérisation qui s'étend à environ 15% de la surface de chaque monomère. Le contact principal entre les deux monomères est réalisé par H11 mais aussi, dans une moindre mesure, par H8, H9 et H10.

La structure générale du ER α -LBD complexé à l'oestradiol est similaire à la structure cristalline d'autres LBD de récepteurs nucléaires (Renaud *et al.*, 1995). Le LBD forme trois couches d'hélices α anti-parallèles contenant une poche hydrophobe dans la partie inférieure de la molécule (Brzozowski *et al.*, 1997). Le site de liaison pour l'E₂ est complètement isolé de l'extérieur et il occupe une grande partie du noyau hydrophobe du ER-LBD. Cette cavité centrale est formée par une partie de H3 (Met 342 à Leu 354), H6 (Trp 383 à Arg 394), H8 (Val 418 à Leu 428), H11 (Met 517 à Met 528), H12 (Leu 539 à His 547) et S1/S2 (Leu 402 à Leu 410). La cavité de fixation du ligand est beaucoup plus grande que le volume nécessaire à la liaison de l'E₂, ce qui permet la fixation de ligands de tailles variables. L'hélice 12 (H12) se ferme sur le ligand, scellant ainsi la poche hydrophobe (figure 6).

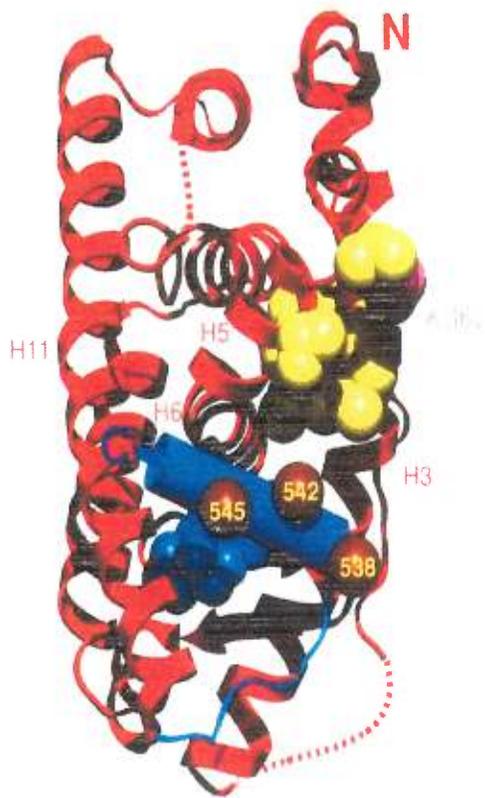
L'E₂ se lie à la cavité du LBD entre les hélices H3, H6 et H11. Ceci permet au LBD d'adopter une conformation correspondant à un niveau de faible énergie. La reconnaissance de l'hormone s'effectue par des liaisons spécifiques de type pont hydrogène et de nombreuses interactions non-polaires entre les acides aminés de la cavité hydrophobe et l'E₂ (figure 7). Le groupement OH du cycle cyclopentane A de l'E₂ fait une liaison hydrogène directe avec le groupement carboxyle de Glu 353 (H3). Le groupement guanidine de Arg 394 (H6) fait un lien avec une molécule d'eau et le groupement 17- β -hydroxyle du cycle cyclopentane D fait un lien hydrogène avec His 524 (H11). Il s'établit aussi des liaisons hydrophobes entre le reste de la molécule et le LBD. Par exemple le cycle aromatique D forme des liaisons non-polaires avec Ile 424, Gly 521 et Leu 525. Cette combinaison de liaisons polaires et non-polaires permet au ER de reconnaître son ligand (E₂) de façon sélective avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (figure 7; Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999). Suite à la fixation de l'E₂ dans la poche hydrophobe, H12 ferme la cavité et emprisonne ainsi le ligand sans interagir directement avec lui.

Le Ral se lie au LBD dans la même cavité que l'E₂. Le groupement hydroxyle du benzothiophène mime l'interaction entre le groupement hydroxyle du cycle cyclopentane A de l'E₂ et Glu 353 (H3). Par contre, la liaison entre "le cycle aromatique D" du Ral et le LBD est différente de celle avec le groupement hydroxyle en position 17- β de l'E₂. Dans les deux cas, il y a formation d'une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle et l'His

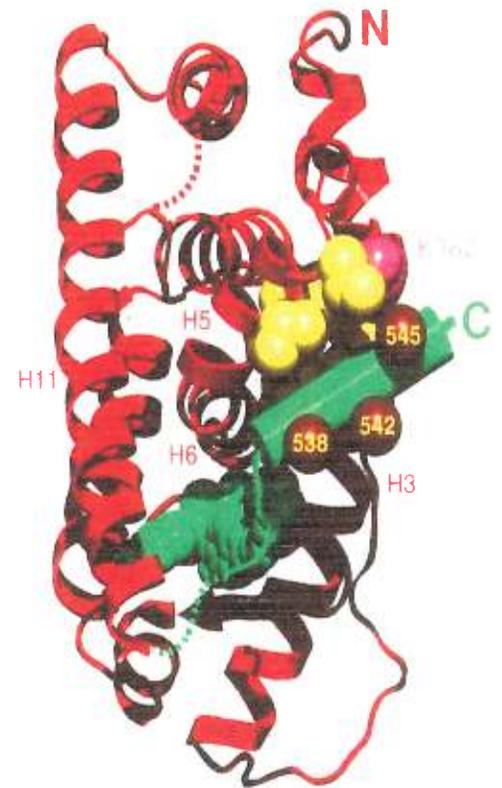
Figure 6. **Structures tridimensionnelles du LBD du ER α en présence d'oestradiol (A) et raloxifène (B).** H12 est représenté comme un cylindre bleu dans A) et vert en B). Les pointillés représentent les régions de la structure qui ne sont pas définies dans la structure cristallographique. Les résidus hydrophobes se trouvant entre H3 et H5 sont en jaune.

Inspiré de Brozowski *et al.*, (1997) *Nature*, **389**, 753-758

A)



B)



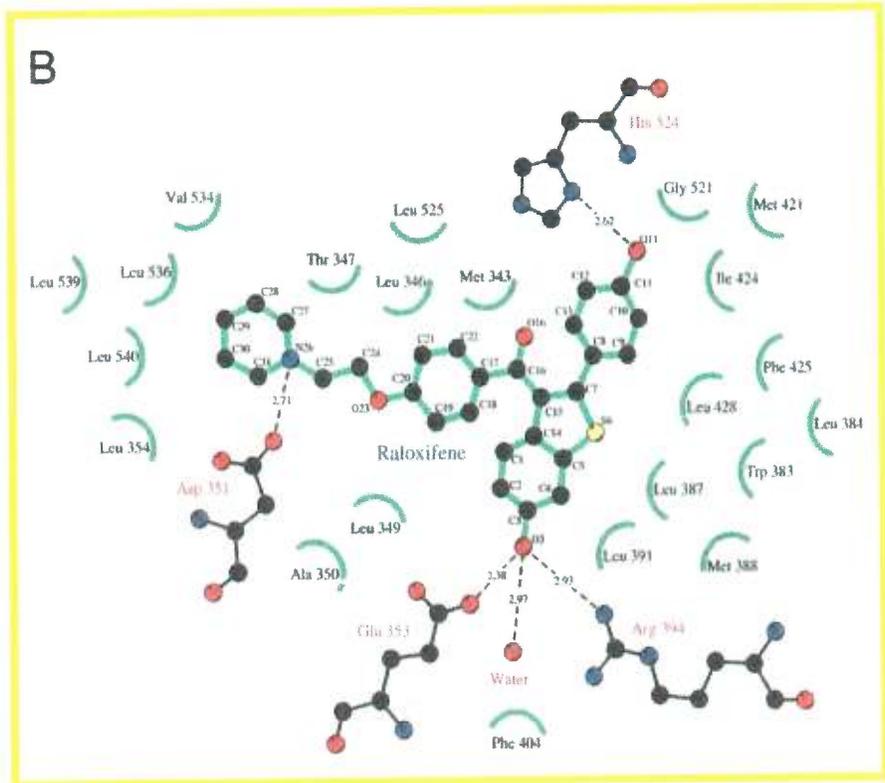
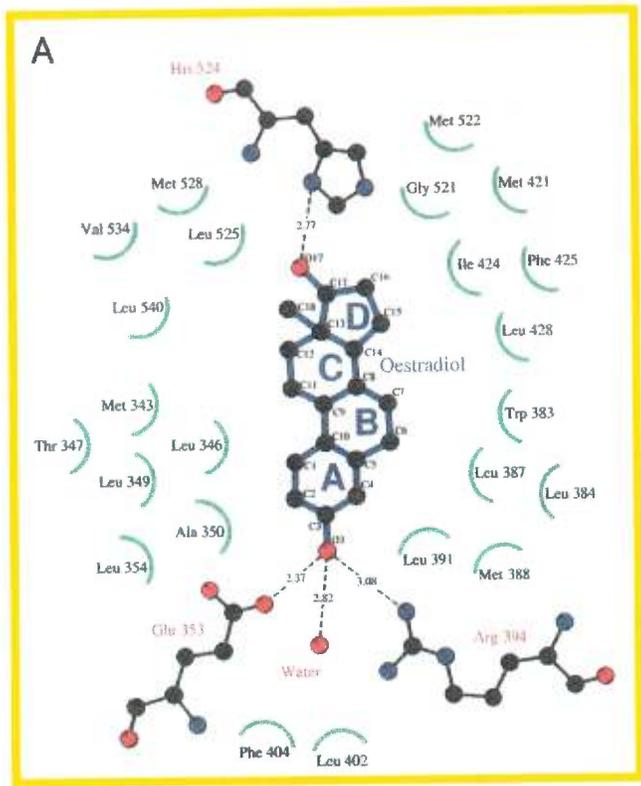
524 (H11), mais cette liaison est déplacée de 5,1 Å de sa position en présence de E₂. Par conséquent, il y a une rotation du groupement imidazole de His 524 pour maintenir une position favorable à la liaison d'hydrogène. Les interactions non-polaires sont les mêmes que dans le cas du E₂-LBD. La chaîne latérale du Ral participe à des liaisons hydrophobes avec les hélices H3, H5/6 et H11 ainsi qu'avec une partie de la boucle située entre les hélices H11 et H12. Cette chaîne latérale interagit avec le LBD également par une liaison hydrogène directe entre l'amine tertiaire du Ral et l'Asp 351 (H3; figure 6). Cette liaison entre la chaîne latérale des antagonistes partiels et l'acide aminé Asp 351 empêche l'interaction stabilisante qui existe dans le complexe LBD-E₂ entre l'Asp 351 et le groupe amide du lien peptidique entre L539 et L540 (H12). Dans le complexe LBD-Ral l'hélice 12, au lieu de refermer la cavité hydrophobe, se repositionne dans un sillon formé par H5 et le C-terminal de H3. Ce déplacement de l'hélice 12 est retrouvé pour tous les anti-oestrogènes ayant une chaîne latérale encombrante (OHT et Ral, figure 6; Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999). A noter cependant que l'emplacement de H12 dans les complexes LBD-Ral et LBD-OHT n'est pas tout-à-fait le même puisque la chaîne latérale du Ral est plus longue que celle du OHT. Certaines interactions sont donc différentes dans les complexes LBD-Ral et LBD-OHT (Brzozowski *et al.*, 1997, Shiau *et al.*, 1998).

2.5 Fonctions de transactivation AF1 et AF2

La fonction AF1 se situe dans la partie N-terminale du récepteur, dans la région A/B. Cette fonction est histo-spécifique et l'activité variable selon la nature du promoteur, autant dans les cellules animales que chez la levure. C'est aussi la fonction d'activation la moins conservée entre les espèces et entre les récepteurs nucléaires (Mc Inerney *et al.*, 1996). La fonction AF1 du ER est formée par un domaine hydrophobe riche en prolines, situé entre les acides aminés 51 à 149 (Metzger *et al.*, 1995). Le groupe de Korach a démontré la présence dans la fonction AF1, de deux domaines séparés B1 et B2 (B1: acides aminés 51 à 62; B2: 121 à 141). Il semble que le domaine B1 ait un effet de transactivation plus important. Le domaine B2 semble interagir avec les 15 derniers acides aminés de la région E du récepteur (Gandini *et al.*, 1997).

Figure 7. **Représentation schématique des interactions entre le LBD du ER α et l'oestradiol (A) ou le raloxifène (B).** Les résidus qui interagissent avec le ligand ou qui se trouvent proches de la cavité sont montrés à leur position approximative. La structure atomique des résidus participant à des liaisons hydrogènes est indiquée.

Inspiré de Brozowski AM *et al.*, (1997) *Nature*, **389**, 753-758



Certains anti-oestrogènes, comme le tamoxifène, possèdent une activité agoniste partielle dans plusieurs cellules comme les CEF ou les MDA-MB-231 en agissant sur des promoteurs ERE-pS₂ ou ERE-TATA (Berry *et al.*, 1990, Mc Inerney *et al.*, 1996). L'utilisation de différents mutants du ER, en transfection transitoire, a permis de prouver que l'activité agoniste de ces anti-oestrogènes est due à la fonction AF1 du récepteur. L'équipe de Katzenellenbogen a démontré que dans les cellules MDA MB-231, l'effet agoniste des anti- oestrogènes nécessite la présence des acides aminés 41 à 64. Il se peut que cet effet soit influencé par le niveau d'expression de différents facteurs de transcription qui pourraient se fixer à ces régions du ER (McInerney *et al.*, 1996).

La fonction de transactivation AF2 se situe dans la partie C- terminale du ER, dans le domaine de liaison du ligand (LBD). Cette fonction est associée à la formation hormono-dépendante d'un sillon formé par les hélices 3,4,5 et 12 du LBD. Ce sillon sert de site de liaison pour les cofacteurs. Onze de ces résidus du sillon interagissent avec les cofacteurs et quatre de ces résidus sont hautement conservés parmi les membres de la famille des récepteurs nucléaire: Lys 362, Gln 375, Leu 379 et Glu 542. L'hélice 12 avec les hélices 3,4 et 5 forment la fonction de transactivation AF2. L'hélice 12 qui possède une face hydrophobe et une face acide est appelée " AF2 core" (Pike *et al.*, 1999; Swartz *et al.*, 1998).

L'activation transcriptionnelle par la fonction AF2 est réalisée en deux étapes. Le ligand agoniste est enfermé dans la cavité hydrophobe par l'hélice 12 qui se positionne au dessus de la cavité comme un "couvercle". Cette position masque les acides aminés hydrophobes de H12 et permet la formation avec certaines régions des hélices 3, 4 et 5 du sillon d'interactions avec les cofacteurs. En présence d'antagonistes à chaîne latérale encombrante, H12 ne peut pas se placer au dessus du site de liaison du ligand et est positionnée dans la partie du sillon formée par H3, 4 et 5, empêchant la fixation des cofacteurs (Brzozowski *et al.*, 1997, Mak *et al.*, 1999, Pike *et al.*, 1999, Shiau *et al.*, 1998).

L'activité de chacune de ces fonctions du ER dépend du type cellulaire ainsi que du promoteur. La fonction AF1 peut montrer une activité transcriptionnelle en absence de la fonction AF2 dans certaines cellules et sur certains promoteurs. Ces deux fonctions travaillent en synergie et sont nécessaires pour une activité transcriptionnelle maximale

(McInerney *et al.*, 1996). Une des hypothèses veut que l'interaction entre les deux fonctions, induite par le ligand, n'est pas directe mais se fait plutôt par l'intermédiaire des cofacteurs présents dans les cellules mammaliennes. Deux observations supportent cette hypothèse. Premièrement, les domaines A/B et E, lorsqu'exprimés chez la bactérie, n'interagissent pas ensemble en présence de E₂ (Kamei *et al.*, 1996, Voegel *et al.*, 1998). Deuxièmement, lorsque le domaine A/B est purifié à partir d'extraits nucléaires de levure, il peut interagir avec un domaine E exprimé chez la bactérie (Kamei *et al.*, 1996; Voegel *et al.*, 1998). Kushner et son équipe ont confirmé en partie cette hypothèse. En effet, ils ont prouvé que la fonction d'activation AF1 peut lier les cofacteurs de la famille p160 (exemple: GRIP-1) et CBP/p300 autant dans le contexte d'un domaine A/B isolé que dans le contexte d'un ER lié à un anti-oestrogène de type Tam. La liaison des cofacteurs augmente énormément l'activité transcriptionnelle en présence de Tam. Contrairement à la fonction AF2 qui se lie au motif "NR box" de ces cofacteurs, la fonction AF1 se lie à une séquence qui se trouve en C-terminal des cofacteurs de la famille p160 (ex. Tif2) séquence "Q rich" (Onate *et al.*, 1998, Webb *et al.*, 1998). La balance entre la synergie AF1/AF2 et l'activité indépendante de la fonction AF1 serait régulée par le niveau de p160 dans chaque type cellulaire (Webb *et al.*, 1998).

La fonction AF2 peut interagir avec un grand nombre de coactivateurs, de façon dépendante du ligand. L'hélice 12 s'avère essentielle à cette transactivation et est appelée "AF2 core". Des mutations ponctuelles dans H12 ont permis de démontrer la présence de plusieurs résidus nécessaires au bon fonctionnement de la fonction AF2. Ces mutations, qui suppriment l'activité AF2 mais qui n'ont aucun effet sur la liaison du ligand au récepteur, suggèrent que ces régions du LBD, participent en présence d'agonistes, à la création d'une surface de reconnaissance pour les molécules qui lient le récepteur à la machinerie transcriptionnelle de base. En effet, lorsque l'agoniste DES est cristallisé en présence du LBD et d'un peptide ayant une séquence spécifique similaire à celle du domaine de liaison au complexe LBD-agoniste des cofacteurs de la famille p160 (NR box II), le peptide se lie par une conformation d'hélice α à un sillon formé par les hélices 3,4,5 et 12 (Shiau *et al.*, 1998).

Dans le complexe E₂-LBD, H12 est positionnée au-dessus de la cavité hydrophobe formée par H3, H5/6 et H11. Dans cette orientation, l'hélice 12 contribue à la surface d'interaction avec les cofacteurs, par l'intermédiaire de ses résidus Asp 538, Leu 539, Glu 542 et Met 543 (Shiau *et al.*, 1998). Les autres acides aminés participant à l'interaction avec les cofacteurs sont Leu 354, Leu 355, Ile 358, Ala 361 et Lys362 (H3), Phe 367 et Val 368 (H4) et Gln 375, Val 376, Leu 379 et Glu 380 (H5) (Shiau *et al.*, 1998).

En présence de Ral et OHT, l'hélice 12 ne peut pas refermer la cavité hydrophobe. La chaîne latérale des anti-oestrogènes dépasse de la cavité hydrophobe et empêche le positionnement de l'hélice 12 par-dessus le site de liaison de l'hormone. La position adoptée par l'hélice 12 en présence de Ral ou de OHT masque des acides aminés de l'hélice qui sont importants pour le recrutement des cofacteurs. De plus, l'hélice 12 interagit avec certains acides aminés du sillon d'interaction avec les cofacteurs, ce qui empêche l'activité transcriptionnelle de la fonction AF2. En présence de Ral et OHT, H12 agit donc comme inhibiteur compétitif de la fixation des cofacteurs. Ral et d'autres antagonistes à chaîne latérale encombrante bloquent ainsi la fonction AF2 par un réarrangement de la surface du domaine AF2.

2.6 Modèles d'activation transcriptionnelle par les récepteurs des oestrogènes

2.6.1 Facteurs de croissance et phosphorylation

Même si les récepteurs stéroïdiens sont des facteurs de transcription activés par la présence du ligand ils sont aussi des phosphoprotéines dont l'activation peut être régulée par la phosphorylation. Cette phosphorylation n'est pas aussi bien caractérisée que celle d'autres facteurs de transcription (Weigel, 1996).

Le groupe de Chambon a démontré que la phosphorylation du ER augmente suite à un traitement par l'E₂. Le Tam et le ICI 164 384 peuvent aussi induire une phosphorylation du ER mais le niveau de phosphorylation est inférieure à celui observé en présence de l'E₂, les sérines et les tyrosines étant les sites majeurs de phosphorylation (Ali *et al.*, 1993).

Les facteurs de croissance tels que l'IGF-1 (insuline-like growth factor-1), le TGF- α (transforming growth factor- α) et le EGF (epidermal growth factor) semblent activer certains récepteurs stéroïdiens (Tsai et O'Malley, 1994, Ram *et al.*, 1998). L'équipe de Green a démontré que dans le cas des cellules HeLa, le EGF active le ER de manière indépendante du ligand (absence de l'E₂), cependant cette activation est inférieure à celle observée en présence de l'E₂. De plus, l'activation en présence de EGF et de l'E₂ est additive ce qui suggère que les deux composés n'utilisent pas les mêmes voies d'activation (El-Tanani, Green 1997). L'activation du ER par les facteurs de croissance semble se faire *via* la phosphorylation de résidus sérine dans la fonction AF1 du ER. Il est à noter que cette activation peut être bloquée par la présence d'antagonistes totaux comme le ICI 182 780 (El-Tanani et Green, 1997). Comme les antagonistes totaux agissent en se liant au ER, cette observation démontre que les facteurs de croissance agissent *via* ER. Des résultats semblables ont été obtenus par d'autres équipes notamment par celle de McLachlan (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1993).

La phosphorylation des facteurs de transcription peut jouer un rôle dans la translocation nucléaire, la liaison à l'ADN, la dimérisation, l'interaction avec d'autres protéines et la transactivation (Arnold *et al.*, 1994; Denton *et al.*, 1992).

La Ser 118, qui se trouve dans le domaine A/B du ER, est un site majeur de phosphorylation (Ali *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995). Le groupe de Chambon a démontré par mutagenèse dirigée que le remplacement de la sérine 118 par une alanine réduit l'activité du ER d'environ 25% et que cette diminution est variable selon le promoteur et le modèle cellulaire utilisés. Cette mutation n'affecte pas la liaison du ER à son ERE ni la localisation nucléaire du ER (Ali *et al.*, 1993, Le Goff *et al.*, 1994). La phosphorylation de la sérine 118 est requise pour l'activité transcriptionnelle de la fonction AF1. Ce résidu est phosphorylé par la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) suite à un traitement par les facteurs de croissance EGF et IGF (Kato *et al.*, 1995). D'autres protéines kinases comme les protéines kinases A et C (PKA et PKC) et la caséine kinase (CK) pourraient être impliquées dans la phosphorylation de certains résidus du ER (Cho et Katzenellenbogen, 1993; Le Goff *et al.*, 1994, Ali *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1994). Les autres sites de

phosphorylation du ER incluent la Tyr 537, la Ser 167, la Ser 104 et la Ser 106 (Arnold *et al.*, 1994; Ali *et al.*, 1993; Le Goff *et al.*, 1994).

A noter que la phosphorylation peut aussi affecter les cofacteurs, régulant ainsi leur activité et indirectement celle des récepteurs nucléaires comme le ER. En effet, le groupe de Chambon a démontré que TIF1 α est une phosphoprotéine. Dans les cellules COS-1, en présence de ER α ou de RXR α , ce cofacteur est phosphorylé et devient hyperphosphorylé en présence de ligand. L'hyperphosphorylation nécessite la liaison du cofacteur au récepteur (Fraser *et al.*, 1998).

2.6.2 Interférence entre ER et d'autres facteurs de transcription

Les récepteurs stéroïdiens interagissent aussi avec d'autres facteurs de transcription comme le AP1 (*activating protein-1*). Cette interaction est indépendante de la présence d'un ERE (Lucibello *et al.*, 1990).

Certains groupes ont démontré une inhibition du ER par le PR (récepteur de la progestérone). Comme le ER et le PR se lient à différents éléments de réponse, l'inhibition doit s'exercer par un mécanisme autre que la compétition pour la liaison à l'ADN (Kraus *et al.*, 1995). En effet, le groupe de Katzenellenbogen a démontré qu'une diminution dans le ratio PR A:PR B ainsi que des changements dans le PRE abolissent l'action répressive sur l'activité transcriptionnelle du ER. De plus, l'élimination des sites de phosphorylation se trouvant dans la région A/B du ER (ser 104,106,118) rend le ER plus sensible à la répression transcriptionnelle par PR. Le type de ligand du ER ainsi que des mutations dans le ERE n'affectent pas la magnitude de la répression, ce qui suggère que le complexe PR-ligand empêche le ER d'interagir de manière productive avec la machinerie transcriptionnelle (Kraus *et al.*, 1997). Ce mécanisme, appelé "*squelching*", correspond à la titration de cofacteurs nécessaires à l'activation par le ER en présence de quantités croissantes de PR.

2.6.3 Complexe de pré-initiation

L'activation transcriptionnelle par l'ARN polymérase II nécessite l'assemblage de complexes d'initiation multiples au niveau de la boîte TATA. La liaison du facteur de transcription TFIID, complexe formé de TBP (*TATA-binding protein*) et d'une dizaine de protéines TAFs (*TBP-associated factors*), est la première étape de l'assemblage du complexe de transcription de base. TFIIA et TFIIB (*transcription factor II A,B*), qui servent de pont entre TBP et l'ARN polymérase II, sont alors recrutés par TFIID (Horwitz *et al.*, 1996), ce qui permet le recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription. TFIIF interagit avec TFIIB et aide au recrutement de l'ARN polymérase II. Les facteurs de transcription TFIIIE et TFIIF ne sont pas nécessaires pour l'initiation de la transcription, on pense qu'ils jouent plutôt un rôle dans le passage de l'étape d'initiation à l'étape d'élongation. Il semble que le ER facilite la formation d'un complexe stable de pré-initiation au niveau du promoteur cible. Ceci augmenterait l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Elliston *et al.*, 1990). Ces résultats ont aussi été prouvés dans le cas du PR (Klein-Hitpass *et al.*, 1990). Les résultats du groupe de O'Malley sont soutenus par la découverte d'interactions hormono-indépendantes entre ER et des membres du complexe de transcription: TFIIB (Ing *et al.*, 1992) et TBP (Sadovsky *et al.*, 1995). Puisque le recrutement de TFIIB au complexe TFIID-ADN est une des étapes limitantes dans la formation du complexe de pré-initiation, l'interaction des récepteurs nucléaires avec TFIIB pourrait stabiliser ou encore faciliter cette étape.

2.6.4 Les cofacteurs

L'activité d'un récepteur dépend de l'environnement cellulaire dans lequel il se trouve ainsi que de la concentration en facteurs de transcription requise pour son activité. Il a été démontré que l'activité fonctionnelle des différents domaines de transactivation du ER varie en fonction du contexte cellulaire (Berry *et al.*, 1990). De plus, la surexpression d'un récepteur inhibe son activité transcriptionnelle ainsi que l'activité transcriptionnelle d'autres récepteurs, mais pas celle d'autres facteurs de transcription (" *le squelching* ").

Puisque la machinerie transcriptionnelle de base est la même pour la transcription de tous les gènes, il doit y avoir des facteurs plus spécifiques à la régulation des récepteurs nucléaires. Ces protéines adaptatrices, les coactivateurs, font le pont entre des activateurs spécifiques et la machinerie transcriptionnelle de base. (Meyer *et al.*, 1992, Shemshedini *et al.*, 1992, Glass *et al.*, 1997; Shibata *et al.*, 1997, Torchia *et al.*, 1998).

Le modèle communément accepté de l'activation transcriptionnelle par les récepteurs stéroïdiens est le suivant. Lors de la fixation d'un agoniste au récepteur, il se produit un changement conformationnel dans le LBD, ce qui permet le recrutement de cofacteurs (coactivateurs). L'interaction entre le récepteur et les coactivateurs permet au récepteur d'interagir plus efficacement avec la machinerie transcriptionnelle de base et aussi d'activer la transcription. La liaison des antagonistes induit un changement conformationnel différent qui empêche le recrutement des coactivateurs par le LBD (Shibata *et al.*, 1997). Dans le cas des anti-oestrogènes partiels, il est possible que l'activité agoniste observée (cellule et promoteur spécifique) soit due à un recrutement possible de certains coactivateurs (ex. famille p160) par la fonction AF1 du ER (Webb *et al.*, 1998). Ceci est en accord avec les observations de l'implication de cette fonction dans l'activité agoniste du Tam (Berry *et al.*, 1990, McInerney *et al.*, 1996).

Des approches biochimiques telles que le "GST pull-down", le double hybride et le "Far Western" ont conduit à la découverte d'un grand nombre de protéines faisant partie de la classe des cofacteurs interagissant avec le ER de manière dépendante du ligand (SRC-1, TIF2, AIB1, RIP 140, Tableau I, Cavailles *et al.*, 1994, Robyr *et al.*, 2000).

En 1994, le groupe de Parker a démontré que RIP 140 est spécifique à la fonction AF2 du ER. RIP 140 interagit avec le LBD du ER seulement lorsque celui-ci est couplé à un agoniste ce qui provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle. En présence d'antagoniste il n'y a pas d'interaction (Cavaillès *et al.*, 1994). Ces résultats sont présentement contestés puisque plusieurs groupes ont démontré une répression de la transcription par les récepteurs nucléaires lorsque RIP140 est surexprimé (Treuter *et al.*, 1998).

En 1995, le groupe de O'Malley a isolé SRC-1 à partir d'une banque d'ADNc humain. SRC-1 est un autre coactivateur qui interagit avec le LBD du PR uniquement en

présence d'un agoniste. Il semble que SRC-1 soit présent dans toutes les cellules testées. En plus d'augmenter l'activité transcriptionnelle de PR, il augmente aussi l'activité transcriptionnelle de GR, de ER, de TR et de RXR (Onate *et al.*, 1995). SRC-1 interagit aussi avec TBP et TFIIID, il est donc possible que cette protéine joue un rôle de pont entre les récepteurs et la machinerie transcriptionnelle de base (Takeshita *et al.*, 1996). SRC-1 fait partie d'une famille de coactivateurs appelés les protéines p160. GRIP-1/Tif-2 est un autre membre de cette famille. GRIP-1 a été cloné chez la souris et Tif-2 est son homologue humain. Cette protéine interagit avec le LBD de GR, du ER et du AR de façon dépendante du ligand (Hong *et al.*, 1996). Le groupe de Kushener a démontré que GRIP-1 interagit aussi avec la fonction AF1 du ER. Cette interaction se fait par un domaine du coactivateur différent de celui utilisé pour l'interaction avec le LBD (Webb *et al.*, 1998). Il se peut donc que la propriété des membres de cette famille d'interagir avec les fonctions AF1 et AF2 du ER favorise une synergie entre les deux fonctions activatrices du ER.

Un autre membre de la famille des p160, récemment découvert est le AIB 1. Ce coactivateur augmente l'activité transcriptionnelle de plusieurs récepteurs nucléaires tels que ER, PR, TR, RAR, RXR et VDR (Robyr *et al.*, 2000). Il est amplifié et surexprimé dans les tumeurs mammaires ER+ ainsi que dans les lignées cellulaires ovariennes (Anzick *et al.*, 1997).

CBP/p300 sont des protéines ubiquitaires qui interagissent de manière dépendante du ligand et qui augmentent l'activité transcriptionnelle de ER, TR RAR, RXR et de PR. De plus, CBP et SRC-1 synergisent dans les cellules pour augmenter l'activité transcriptionnelle du ER (Smith *et al.*, 1996). La même année, le groupe de Rosenfeld a démontré une interaction entre ces deux protéines (Kamei *et al.*, 1996).

Plusieurs résultats suggèrent que certaines protéines telles NCoR et SMRT soient impliquées dans un mécanisme de répression de l'activité transcriptionnelle. SMRT s'associe au complexe RAR/RXR en absence de ligand lorsque le récepteur se trouve lié à son élément de réponse ou libre dans la solution. NCoR s'associe au TR en absence de ligand et au ER en présence d'anti-oestrogènes partiels (Zhang *et al.*, 1998). Le complexe formé par NCoR/SMRT et d'autres protéines inhiberait l'activité transcriptionnelle de ER,

TR et de RAR. Les deux corépresseurs présentent une grande similitude, ce qui suggère l'existence d'une famille de corépresseurs.

L'activité agoniste de certains antagonistes pourrait être réalisée par la balance dans certaines cellules spécifiques entre les coactivateurs et les corépresseurs. Il se pourrait que la présence de coactivateurs, membres de la famille p160, permette une interaction entre les deux domaines d'activation AF1 et AF2 (Webb *et al.*, 1998).

2.6.5 Structure de la chromatine

Le modèle classique d'activation transcriptionnelle par le ER est le suivant. Suite à la liaison du ligand au récepteur, ce dernier se dissocie des protéines de choc thermique, dimérise, se lie spécifiquement à son élément de réponse et active la transcription de gènes cibles. La formation du complexe de pré-initiation à la base de l'activation d'un gène est contrôlée de deux manières: par l'interaction directe entre le récepteur et les composantes de la machinerie transcriptionnelle et/ou par le recrutement de facteurs intermédiaires (coactivateurs). De plus, certains de ces coactivateurs possèdent des fonctions de modification de la chromatine, facilitant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN. Le groupe de O'Malley a démontré en 1997 que le coactivateur SRC-1 possède une activité intrinsèque histone acétyltransférase (HAT). De plus, SRC-1 peut aussi interagir avec d'autres HAT (Spencer *et al.*, 1997). Cette activité HAT ainsi que l'interaction avec des facteurs de la machinerie transcriptionnelle de base représentent les deux mécanismes par lesquels les récepteurs stéroïdiens et les coactivateurs associés augmentent la formation et la stabilité du complexe de pré-initiation. CPB/p300 possède aussi une activité histone acétyltransférase (Ogryzko *et al.*, 1996). Les corépresseurs NCoR et SMRT possèdent une activité histone déacétylase, ce qui permet de penser que la répression de l'activité transcriptionnelle pourrait se faire par le ré-établissement de l'état inactivé de la chromatine (Hassing *et al.*, 1997).

L'interaction entre les facteurs de transcription et l'ADN est modulée par la structure de la chromatine. Le nucléosome est le premier degré d'organisation de la

Tableau I. Exemples de protéines pouvant interagir de manière dépendante du ligand avec les récepteurs nucléaires.

Protéine	Protéine homologue	Récepteur d'interaction	MM (Kd)
----------	-----------------------	----------------------------	------------

coactivateurs

SRC-1	Tif-2 GRIP-1	PR, GR, ER , TR, RXR, RAR,CBP	160
Tif-2/ GRIP-1 Aib-1	SRC-1	ER , RAR α , RXR α ,TR α , PR, GR, AR	160
Rip 140		ER	127
Tif -1	T18 KAP-1	RXR, RAR α , VDR, PR, ER	112
CBP	p300	PR, ER , RXR, SRC-1	300

corépresseurs

SMRT/ TRAC2	NCoR TRAC1	TR, RAR, RXR, v-ErbA	168
NCoR	TRAC1 SMRT/TRAC2	TR, RAR, RevErb	270

chromatine. Il est constitué par l'enroulement de 146 paires de bases d'ADN autour d'un octamère de protéines: les histones (van Holde et Zlatanova, 1996; Voet et Voet, 1990). Les histones sont des protéines basiques, riches en lysines et arginines. Les charges positives de ces protéines permettent une interaction avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Le nucléosome constitue donc la première barrière à l'activation transcriptionnelle en limitant l'accès des facteurs de transcription à l'ADN (Paranjape *et al.*, 1994). Les cellules eucaryotes ont développé des mécanismes pour surmonter cette répression. L'acétylation des histones est un de ces processus (Grunstein, 1997). L'acétylation des histones est un processus post-traductionnel réversible qui consiste en la modification de résidus lysine dans la partie N-terminale des histones par fixation covalente de groupes acétyle. Cette acétylation des histones neutralise les charges positives et déstabilise les nucléosomes rendant l'ADN accessible aux facteurs de transcription.

L'acétylation des histones est réalisée par les histones acétyltransférases et la déacétylation par des histones déacétylases (Kuo et Allis, 1998, Pazin et Kadonaga, 1997).

2.7 Mutations dans le récepteur des oestrogènes affectant l'activité des anti-oestrogènes

Bien que de nombreuses mutations conduisant à une activité agoniste en présence d'anti-oestrogènes aient été caractérisées *in vitro*, très peu de mutations ponctuelles ont été trouvées dans le ER.

Des mutations ponctuelles dans la région AF2 peuvent changer de manière dramatique la pharmacologie des anti-oestrogènes. Des mutations en position L543/L544 ou M547/L548 (groupes d'acides aminés hydrophobes) convertissent le ER en un récepteur capable de transactiver non pas seulement en présence d'oestrogène mais aussi en présence de Tam et de ICI 164 384 (Mahfoudi *et al.*, 1995). Le groupe de Katzenellenbogen a démontré que la substitution d'une leucine par une glutamine à la position 540 permet au ER de reconnaître les antagonistes comme des agonistes et inversement, l'E₂ est reconnu comme un antagoniste. La présence de telles mutations dans la région AF2 du récepteur peut, théoriquement, être impliquée dans la résistance au traitement par Tam (Montano MM

et al., 1996). Le groupe de Jordan a démontré qu'une simple mutation dans le LBD, une valine qui est remplacée par une glycine à la position 400, réduit le bruit de fond et augmente l'effet oestrogénique du Tam et d'autres anti-oestrogènes (Tora *et al.*, 1989, Jiang et Jordan, 1992).

Plusieurs groupes ont tenté d'identifier des mutations du ER dans des tumeurs mammaires ou des lignées cellulaires mammaires stimulées par le Tam (Gottardis et Jordan, 1988; Fuqua *et al.*, 1991; Wolf et Jordan, 1994, Bilimoria *et al.*, 1996). Le groupe de Bukowski a séquencé les huit exons de l'ADN_c du ER provenant de 20 tumeurs mammaires résistantes au Tam ainsi que de 20 tumeurs sensibles au Tam. Sur les 40 tumeurs analysées, ils n'ont trouvé que deux mutations, suggérant que le mécanisme principal à la base de la résistance au Tam ne passe pas nécessairement par l'apparition de mutations du ER (Karnik *et al.*, 1994).

Une mutation identifiée dans une tumeur stimulée par le Tam a été découverte par le groupe de Jordan (Gottardis et Jordan, 1988). Ils ont démontré que des tumeurs dérivées des cellules MCF-7 (lignée cellulaire mammaire ER+) implantées chez des souris ovariectomisées finissent par être stimulées par le Tam aussi bien que par E₂ lors d'un traitement à long terme (six mois), mais sont toujours inhibées par les anti-oestrogènes totaux (Gottardis et Jordan, 1988). Le séquençage du ER cloné à partir d'une de ces tumeurs a mis en évidence une mutation ponctuelle qui remplace un aspartate par une tyrosine à la position 351 du ER (D351Y). L'ADN_c du ER mutant a par la suite été transfecté de manière stable dans les cellules MDA-MB-231 (lignée cellulaire mammaire ER-). Le K_d du mutant D351Y pour E₂ est légèrement plus faible (0,75 nM) que celui du ER sauvage transfecté de manière permanente dans les mêmes cellules (0,11 nM). Il a été prouvé que le traitement par E₂ des cellules ER- transfectées avec le ER inhibe la croissance cellulaire. Le traitement par E₂ des deux lignées cellulaires (porteuses des ER sauvage et ER muté) inhibe leur croissance tandis que le traitement par un anti-oestrogène total n'affecte pas leur croissance. Par contre, le traitement par Tam inhibe la croissance de la lignée porteuse de la mutation D351Y mais n'affecte pas la croissance de la lignée ayant le ER sauvage. Ceci prouve que la mutation D351Y confère au Tam un effet oestrogénique qui n'est pas retrouvé dans les cellules ayant le ER sauvage (Catherino *et al.*, 1995). L'effet

oestrogénique du Tam ainsi que du Ral avec le mutant ER D351Y a aussi été démontré sur l'expression du TGF- α , un gène cible des oestrogènes. Cet effet est plus modeste lors de la cotransfection transitoire du mutant D351Y et d'un gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un ERE dans les cellules MDA-MB-231, et de la transfection d'un gène rapporteur luciférase sous contrôle d'un ERE dans les cellules transfectées de manière stable avec le mutant D351Y (Catherino et Jordan, 1995; Levenson *et al.*, 1997; Catherino *et al.*, 1997; Levenson et Jordan, 1998).

Il semble donc que plusieurs mécanismes puissent être à la base de la résistance au Tam. Une meilleure connaissance du mécanisme de résistance au traitement par les anti-oestrogènes pourrait nous permettre de trouver d'autres cibles thérapeutiques et/ou de développer d'autres anti-oestrogènes plus efficaces.

3-Buts principaux du projet de recherche

Les anti-oestrogènes sont largement utilisés comme traitement adjuvant et comme agents chimiopréventifs dans le traitement du cancer du sein. Actuellement, le Tam est l'anti-oestrogène le plus utilisé. Cet anti-oestrogène, en plus de démontrer une activité anti-oestrogénique au niveau des tumeurs mammaires, montre une activité oestrogénique bénéfique au niveau de la masse osseuse et du système cardiovasculaire. Par contre, il démontre une activité oestrogénique non désirée au niveau de l'utérus en augmentant l'incidence de tumeurs de l'endomètre.

Présentement, l'effort porte sur le développement de nouveaux anti-oestrogènes qui n'ont pas ce potentiel tumoral dans les tissus utérins. Le développement de ce type d'anti-oestrogènes passe par une bonne compréhension du mécanisme moléculaire à la base de l'effet oestrogénique observé dans certains tissus.

Récemment, les études cristallographiques du ER LBD en présence d'E₂ ou d'anti-oestrogènes ont permis d'identifier un acide aminé dans le LBD du ER qui semble interagir spécifiquement avec la chaîne latérale des antagonistes partiels (Brzozowski *et al.*, 1997).

Il a été proposé que le pont hydrogène entre l'amine tertiaire de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels (Tam, Ral) et l'acide aminé aspartate (D) en position 351 du LBD

soit nécessaire au caractère antagoniste des anti-oestrogènes partiels. La substitution de cet acide aminé par une tyrosine (Y) résulte en la perte de l'effet antagoniste des anti-oestrogènes et en l'augmentation de l'activité oestrogénique (Gottardis et Jordan, 1988; Catherino et Jordan, 1995; Brzozowski *et al.*, 1997; Levenson *et al.*, 1997; Catherino *et al.*, 1997; Levenson et Jordan, 1998).

Le but de ce projet est de vérifier l'importance fonctionnelle de l'interaction entre l'acide aminé D351 du LBD et la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels tels que le Tam et le Ral.

L'accent sera mis sur l'étude de l'implication de cette mutation (D351Y) dans i) l'affinité du ER pour les anti-oestrogènes partiels et totaux, ii) l'activité transcriptionnelle du ER en présence d'anti-oestrogènes partiels et totaux, iii) l'interaction du ER avec des cofacteurs spécifiques.

Pour étudier l'importance de l'aspartate en position 351 du ER, nous avons introduit, par mutagenèse dirigée, une série de mutations ponctuelles à cette position. Ces mutants ont par la suite été testés pour i) leur affinité pour différents types d'anti-oestrogènes par "*hormone binding assay*", ii) leur activité transcriptionnelle par transfection transitoire dans des lignées ER-, iii) leur capacité à interagir avec certains coactivateurs par "*GST-pulldown assays*".

Ces expériences nous permettront de clarifier le rôle de l'acide aminé aspartate en position 351 du ER: est-t-il vraiment important dans la stabilisation de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels? De plus, ces expériences devraient nous aider à comprendre la différence entre le mécanisme d'action des anti-oestrogènes totaux et partiels, ce qui est essentiel pour la conception rationnelle de nouveaux anti-oestrogènes plus performants dans le traitement du cancer du sein.

CHAPITRE II- ARTICLE

ASPARTATE 351 OF ESTROGEN RECEPTOR α IS NOT CRUCIAL FOR THE
ANTAGONIST ACTIVITY OF ANTIESTROGENS.

Silvia Anghel¹, Véronique Perly¹, Geneviève Melançon¹, Annie Barsalou¹, Samuel Chagnon¹, Angelika Rosenauer², Wilson H. Miller, Jr^{2,3} and Sylvie Mader^{1,3,4}

¹Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada , ²Lady Davis Institute and SMBD Jewish General Hospital, and ³McGill Center for Translational Research in Cancer, 3755 Côte St. Catherine, Montréal, Québec, H3T 1E2, Canada.

This work was supported by operating grants from the Medical Research Council of Canada to SM (#MT-13147) and from the Canadian Breast Cancer Research Initiative to WM.

⁴To whom correspondence should be addressed: Department of Biochemistry, Université de Montréal, C.P.6128 Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

Tel: 514 343 6111 #5173, Fax: 514 343 2210, E-mail: sylvie.mader@umontreal.ca

SUMMARY

The antagonist activity of antiestrogens is due to the presence of a long carbon side chain at positions 7α or 11β or equivalent on their steroid or steroid-like skeletons. These side chains establish hydrophobic interactions with amino acids of the estrogen receptor α (ER α) ligand binding domain. In addition, a hydrogen bond formed between amino acid D351 and the tertiary amine present at the end of the side chain of partial antiestrogens is considered to be crucial for their antiestrogenicity. Here, we have investigated the role of D351 in antiestrogen action. Our results indicate that disruption of the negative charge at position 351 does not increase the agonist activity of partial antiestrogens and thus that the hydrogen bond with the antiestrogen side chain is not determinant in positioning the side chain in an antagonist position. The negative charge at position 351 was not required for transcriptional activity in the presence of hormone, but its presence was necessary for basal activity of the wild-type receptor and constitutive activities of mutants L536P and Y537A, suggesting a role of D351 in stabilizing the active conformation of ER α . This stabilizing role of D351 could be due to interaction of D351 with the amide group of the peptide bond between L539-L540 in helix 12 observed in the active conformation of the ER α ligand binding domain. Disruption of this interaction by antiestrogen binding could contribute to the antagonist activity of antiestrogens.

INTRODUCTION

Estrogen regulates target gene expression by binding to specific nuclear receptors that function as ligand-dependent transcription factors. Estrogen receptors contain two transcription activation domains, AF1 at the N-terminus and AF2 in the C-terminal ligand-binding domain (1-3). Several proteins interact with AF2 in the presence of estrogen, some of which have the properties of transcriptional coactivators (4-6). For instance, the p160 family of coactivators, which in human includes the three proteins SRC1/N-CoA1 (7, 8), TIF2/GRIP1 (9, 10) and AIB1/ACTR/RAC3 (11-13), can interact with most nuclear receptors in a ligand-dependent manner and potentiate transcription of their target genes.

The crystal structures of several nuclear receptor ligand-binding domains (LBDs) have now been determined (14-19), and have revealed a striking conservation in spite of modest sequence similarity (20). The LBD folds into a structure described as a sandwich of alpha helices with a central hydrophobic ligand-binding pocket. In the presence of ligand, helices 3, 5 and 12 form a hydrophobic groove (21-24) important for interaction with the LXXLL motifs (8, 25-27) found in the p160 family members and also in other coactivators. However, the crystal structure of estrogen receptor α (ER α) revealed that helix 12 is repositioned in the presence of antagonists tamoxifen (Tam) or raloxifene (Ral), thereby disrupting the surface of interaction with coactivators (16, 23). The side chain of these antiestrogens plays an important role in displacing H12. This suggests that amino acids of the ligand-binding domain that interact with the antiestrogen side chain play an important role in the transcriptionally inactive conformation of this domain. It has been suggested that integrity of aspartate 351, which forms a hydrogen bond with the tertiary amine present at

the end of the side chains of Tam and Ral, is the key to the antiestrogenic character of these analogs (28). Indeed, a mutation of D351 to tyrosine was isolated from an MCF7 tumor variant that was not inhibited but rather stimulated by Tam (29, 30). Both Tam and Ral also behaved as agonists for expression of the estrogen target gene TGF- α in MDA-MB-231 cells stably transfected with this mutant of ER α , while the full antiestrogen ICI182,780 remained inactive (28).

Here we have introduced several mutations at position 351 and tested the functional consequences of these changes on ER α transactivation properties in the presence of estrogen and of antiestrogens. Our results demonstrate that D351 can be mutagenized to Gly, Ala or Val without diminishing the antagonist activity of antiestrogens. However, we provide evidence that interaction of the antiestrogen side chain with D351 may contribute to the antagonist activity of partial antiestrogens by preventing a stabilizing effect of D351 on the active conformation of the wild type ER LBD.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Cell culture media and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Life Technologies. Estradiol, 4-hydroxytamoxifen (OHT) and ICI182,780 were purchased from Sigma. RU39,411 and RU58,668 were kind gifts from P. Vandeveld, Hoechst-Marion-Roussel.

Expression vectors and mutagenesis of the estrogen receptor.

Mutations were introduced in the ER cDNA by site-directed mutagenesis using PCR amplification (the sequence of oligonucleotides used for mutagenesis is available upon request). Expression plasmids for mutants ERs were generated by subcloning of a Hind III/BamHI fragment of 768 bp into the pSG5-HEGO expression vector. Two clones generated by independent PCR reactions were isolated for each mutant and characterized by restriction digest and sequencing. Mutants ERG400V, ERL536P and ERY537A have been described previously (31-35). Vector pSG5-TIF2.1 expressing high levels of a truncated TIF2 that contains both the LXXLL motifs and the Q rich region was described previously (36).

Cell culture and transient transfection experiments.

For CAT assays, HeLa cells were transiently cotransfected with pSG5 estrogen receptor expression vectors (0.5 μ g), with the ERE3-TATA-CAT reporter vector (2 μ g, (37)) and with the CMV- β -Gal internal standard construct (2 μ g) using the calcium-phosphate co-precipitation technique. Precipitates were washed 24 h after transfection and cells were

incubated in the presence of hormones (as indicated) for another 24h before harvesting. Whole cell extracts were prepared in 0.25 M Tris HCl pH7.5 by three cycles of freeze-thawing and were standardized for β -Galactosidase activity. CAT assays were performed as previously described (37). Each transfection was carried out in duplicate or triplicate and repeated at least three times.

For western blotting, gel shift and hormone binding assays, the wild-type and mutant receptors were overexpressed in COS-7 cells by transient transfection of 15 μ g of pSG5 expression vectors containing wild-type or mutant ER α cDNAs using the calcium phosphate coprecipitation technique.

Western blotting

Whole cell extracts from transfected COS-7 cells were analyzed by sodium dodecyl sulfate (SDS)-8% polyacrylamide gel electrophoresis, transfer onto nitrocellulose and incubation with anti-ER α mouse monoclonal antibodies B10 and F3 (obtained from Prof. P. Chambon). Complexes were revealed by ECL (NEN Life Science Products) as recommended by the manufacturer.

Gel shift assays

Complex formation between wild-type or mutant ERs and a consensus ERE probe from the vitellogenin A2 gene was determined as previously described (38). Essentially, cell extracts from transfected COS-7 cells were preincubated with poly dI-dC (2 μ g) for 15 min on ice prior to addition of the probe (100 000 cpm) and incubation at 25 °C for 30 min. Receptor-

DNA complexes were resolved from unbound DNA in 6% non denaturing polyacrylamide gels in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer and visualized by autoradiography.

Ligand binding assays

Whole cell extracts from transfected COS-7 cells were prepared in high salt buffer (50 mM Tris, 1.5 mM EDTA pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 % glycerol, 10 mM Na Molybdate, 2 mM β -Mercaptoethanol and protease inhibitors) by three cycles of freeze-thawing. Protein content was determined by Bradford assays (BioRad). For each binding reaction 80 μ g of protein extract were used; each assay was carried out in duplicate. To the protein extract was added tritiated estradiol (6,7- 3 H] oestradiol, Amersham Pharmacia Biotech), with or without a 100-fold excess of cold estradiol, and high salt buffer to a final volume of 50 μ l. After incubation for 2 h at room temperature followed by 10 min on ice, 50 μ l of high salt buffer containing 2 % charcoal (Aldrich Chemical Company Inc., Activated Carbon Norit SA3-100 mesh) and 0.1 % of Dextran T-70 (Pharmacia Biotech) were added to the samples. After 15 min incubation on ice and centrifugation, 90 μ l of supernatant were counted by scintillation counting.

GST pull-down assays

pSG5 plasmids containing cDNAs for wild-type or mutant ERs were linearised with BamHI, transcribed and translated *in vitro* in reticulocyte lysate (Promega) in the presence of [35 S]-methionine (Mandel) according to the manufacturer's instructions. Glutathione S-transferase (GST) fusion proteins were expressed in E. coli BL21 cells by IPTG induction. GST fusion proteins were bound to glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia

Biotech) by incubation of the beads with 1 ml of crude bacterial extract in GST Buffer (50 mM Tris Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.3 mM dithiothreitol, 5 % glycerol, 0.1 % Nonidet-P40 and protease inhibitors). Beads bound to GST fusion protein or GST alone were incubated with *in vitro* translated wild-type or mutant ERs (EF region only) in the presence of vehicle or 1 μM ligand at 4°C , overnight. The beads were then washed three times with 800 μl of GST buffer, boiled for 2 min in 2X SDS Laemmli buffer and electrophoresed on a SDS-10 % polyacrylamide gel. Gels were fixed with 20 % methanol, 10 % acetic acid for 15 min, rehydrated for 15 min, washed 15 min in a 1 M salicylate solution and vacuum-dried. Autoradiography was performed overnight.

RESULTS

Mutations of ER α that suppress the negative charge at position D351 have wild-type levels of estradiol-induced transcriptional activity.

Several point mutations were introduced in wild type human ER α (HEG0) at position 351 in helix 3 of the ligand binding domain. The aspartate residue was replaced by the hydrophobic amino acids alanine or valine, by the polar amino acid tyrosine or by the longer negatively charged residue glutamic acid; in addition, the effect of complete removal of the amino acid lateral chain at position 351 was investigated by replacement with a glycine residue (Fig. 1A). HEG0 and all mutants were expressed at similar levels after transient transfection into COS-7 cells (Fig. 1B) or HeLa cells (data not shown). The effects of these mutations on ER α transcriptional activity was investigated by cotransfection of expression vectors for each mutant together with a CAT reporter vector containing the minimal ERE3-TATA promoter. Levels of transcriptional activity generated from the reporter construct in the absence of exogenous hormone differed significantly between wild type and mutant receptors (Fig. 2, inset). While basal levels of activity with mutant HED351E were similar to those observed with HEG0, all other mutants generated very low or undetectable levels of activity in the absence of added hormone. However, levels of transcription achieved with all tested HED351 mutants at saturating concentrations of estradiol (10 nM and above) were comparable to those observed with HEG0 (Fig. 2).

To investigate whether recruitment of coactivators is similar with wild-type or mutant receptors, we performed GST pulldown assays using a fusion protein between GST and the

Fig. 1 : Expression of ER α mutants at position 351

A. Mutations introduced at position 351. **B.** Expression vectors for wild-type and mutant ER α (15 μ g) were transiently transfected into COS-7 cells. Whole cell extracts were analyzed by western blotting using a monoclonal antibody directed against the A/B region of human ER α (B10).

A)

Asp (D)	-CH₂-COOH	Gly (G)	-H
Glu (E)	-CH₂-CH₂-COOH	Ala (A)	-CH₃
Tyr (Y)	-CH₂--OH	Val (V)	-CH₂-(CH₃)₂

B)

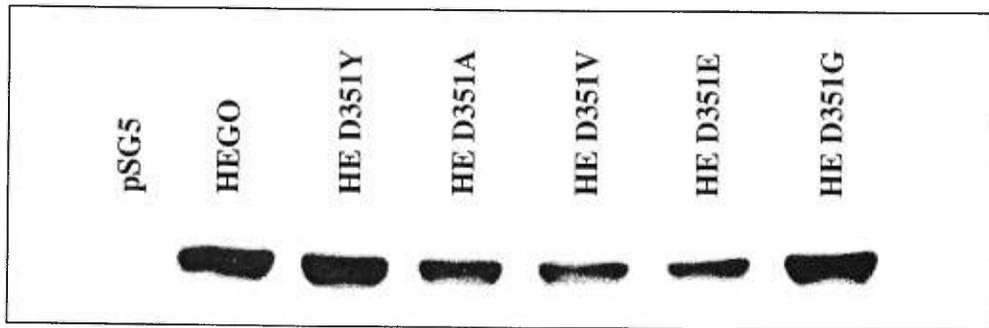
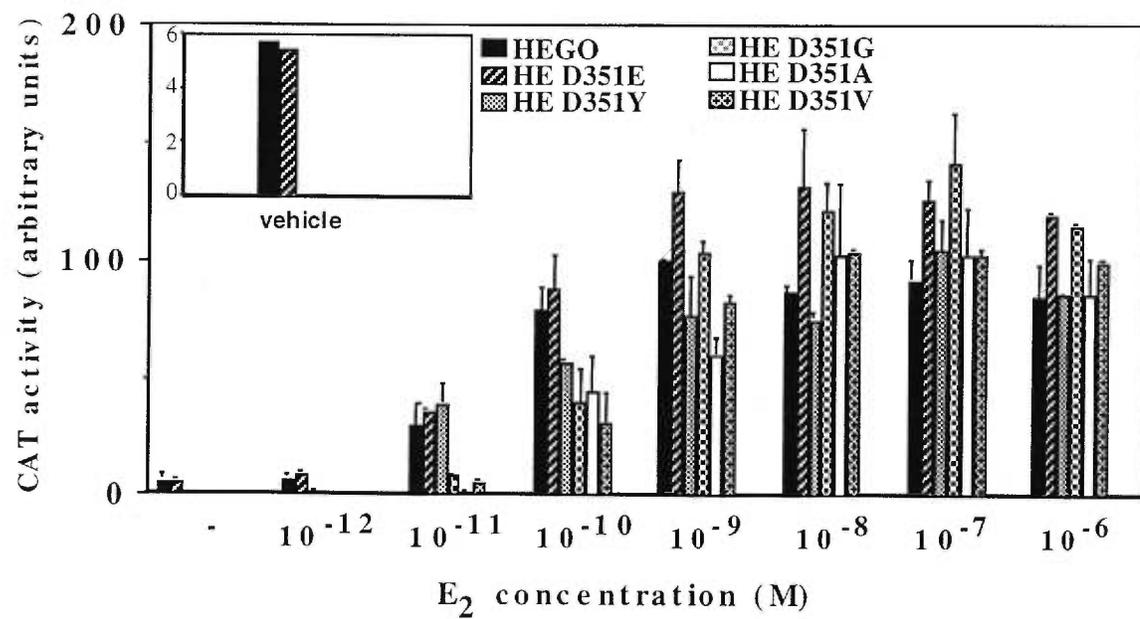


Fig. 2 : Mutations that suppress the negative charge at position 351 reduce basal activity of the ER without affecting estradiol-induced transcription.

Expression vectors for wild-type or mutant ER α s (0.5 μ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2 μ g) and the internal control vector CMV- β Gal (2 μ g). CAT activity was measured in extracts from cells treated with varying concentrations of estradiol. The inset presents the basal activities of wild-type or mutant receptors.



coactivator TIF2.1 (36). Background levels of binding were observed in the absence of hormone or in the presence of antiestrogens OHT or ICI182,780. In the presence of estradiol, recruitment by the fusion protein of the HED351G, HED351V, and HED351Y mutants was comparable to that of wild-type ER α (about 10% of input protein, see Fig. 3), consistent with the transactivation data.

Elimination of the negative charge at position 351 does not increase the agonist activity of partial antiestrogens.

The full antiestrogen ICI182,780 (100 nM) fully repressed transcriptional activity of HEG0 and all the D351 mutants on the ERE3-TATA promoter (Fig. 4A). Weak transcriptional activity was detected in the presence of the partial antiestrogen 4-hydroxytamoxifen (OHT, 100 nM) with HEG0 and mutants HED351E and HED351Y (Fig. 4A). Activity of mutant HED351Y in the presence of OHT was comparable to those of wild-type and HED351E, but was elevated relative to its undetectable levels of basal activity. Similar results were obtained with the partial antiestrogen RU39,411 (data not shown). On the other hand, transcriptional activity of mutants HED351G, HED351A or HED351V was undetectable in the presence of OHT (Fig. 4A).

We next investigated whether increased concentrations of coactivators could boost the agonist activity of OHT with mutants at position 351. Expression vectors for coactivators of the p160 family (TIF2, SRC1 and AIB1) were transiently cotransfected in HeLa cells together with an expression vector for wild-type ER α and the reporter vector ERE3-TATA-CAT. Induction of estradiol-dependent transcription was maximal when

Fig. 3 : Mutations that suppress the negative charge at position 351 do not affect *in vitro* recruitment of TIF2 in the presence of estradiol.

GST beads bound to a fusion protein between GST and TIF2.1 or to GST alone were incubated with *in vitro* translated wild-type or mutant ERs in the presence of vehicle, estradiol or antiestrogens (100 nM) overnight at 4°C. After washing, protein samples were released from the beads by boiling in Laemmli buffer and separated by electrophoresis on an SDS-10% polyacrylamide gel.

GST GST-TIF2
HEGO (EF)



GST-TIF2
HE D351Y (EF)



GST-TIF2
HE D351G (EF)



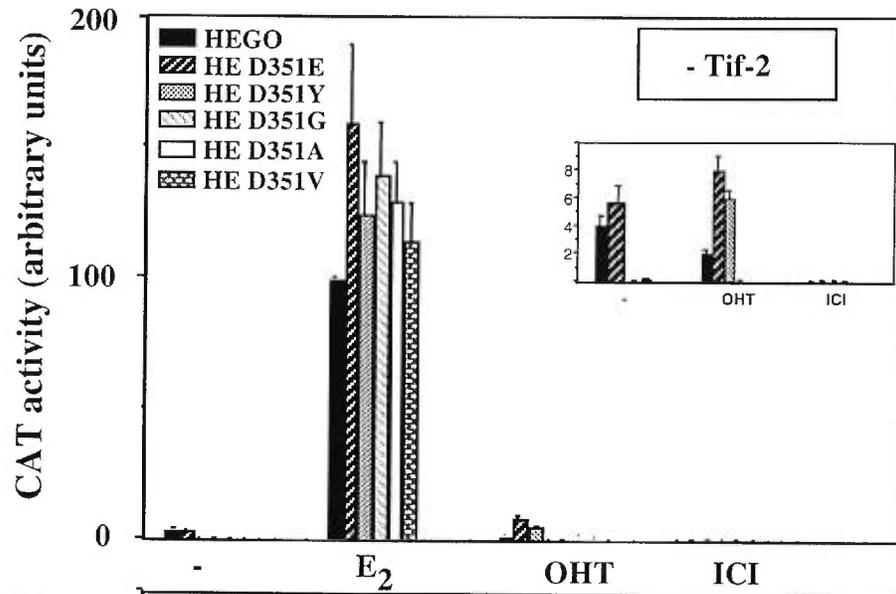
GST-TIF2
HE D351V (EF)



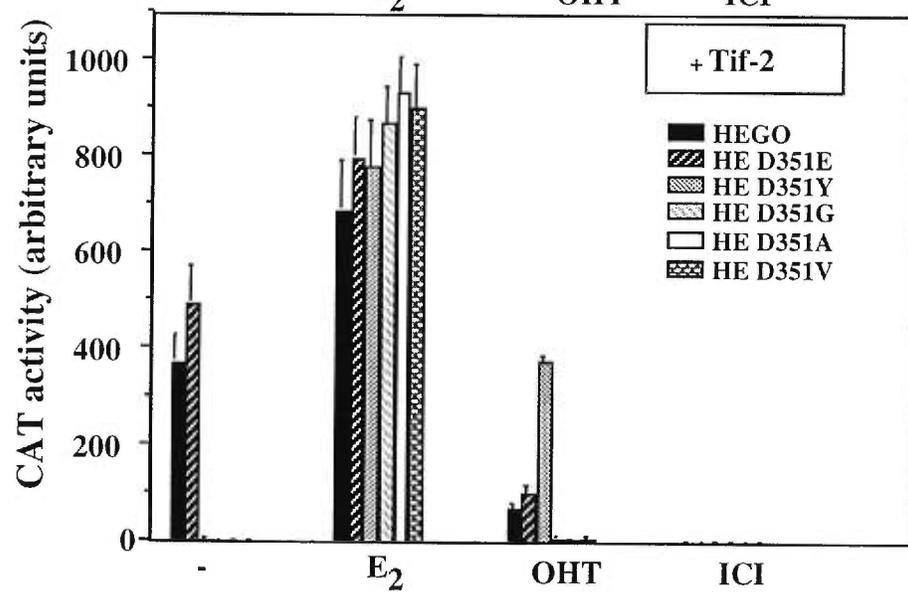
Fig. 4 TIF-2 overexpression does not increase transcriptional activity of hydrophobic mutants of D351 in HeLa cells treated with OHT.

Expression vector for wild-type or mutant ERs (0.5 μ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2 μ g), the internal control vector CMV- β Gal (2 μ g) and the pSG5 vector (A) or pSG5TIF-2.1 vector (2 μ g) (B, C). CAT activity was measured in extracts from cells treated with estradiol (25 nM), 4-hydroxytamoxifen (100 nM, B, or variable concentrations, C) or ICI 182, 780 (100 nM).

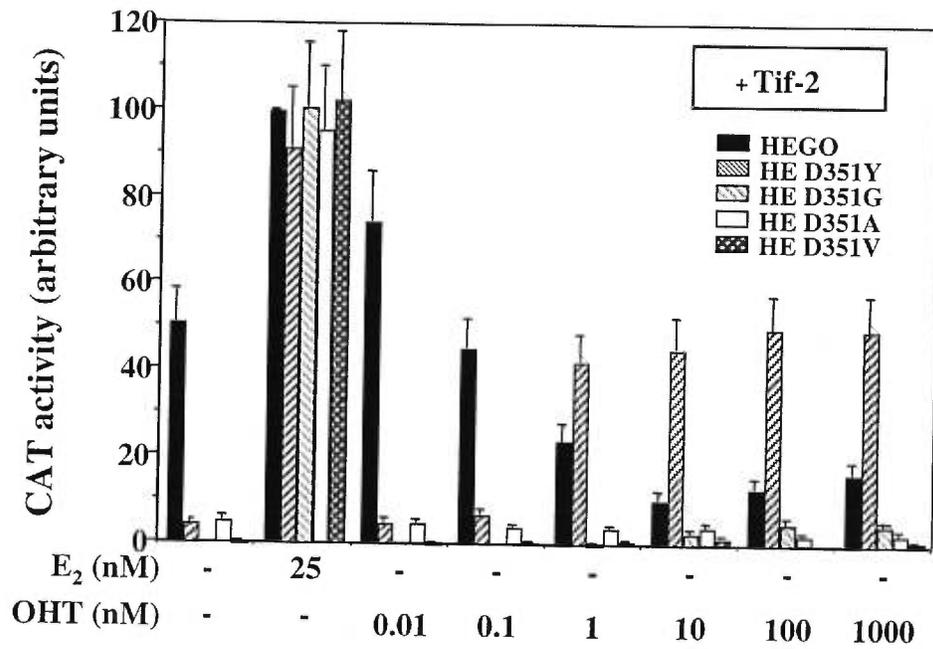
A)



B)



C)



cotransfecting the expression vector pSG5-TIF2.1 (36, data not shown). Estradiol-induced transcriptional activity of HEG0 or of the D351 mutants was increased by ~7-fold in the presence of TIF2.1 (Fig. 4B). Strikingly, basal activity of the wild type or of the HED351E mutant was increased 80-fold, while basal activity of all other mutants was still undetectable. No activity of wild-type ER α or any of the mutants was detected in the presence of the full antagonist ICI182,780 (Fig. 4B). Activity of HED351Y with OHT was stimulated 40-fold in the presence of TIF2.1, converting OHT into an almost full agonist (Fig. 4B). Activity of wild-type ER α or of HED351E in the presence of OHT was also stimulated, although levels of transcriptional activity reached were lower than with HED351Y. On the other hand, transcriptional activity of the HED351G, A, or V mutants in the presence of OHT remained very low even in the presence of excess TIF2.1 (Fig. 4B). Treatment of HeLa cells cotransfected with expression vectors for ER α mutants and pSG5-TIF2.1 with increasing concentrations of OHT demonstrates that while transcriptional activity of the D351Y mutant reached a plateau at nanomolar concentrations of OHT, activity of the D351G, D351A and D351V mutants remained very low in the nanomolar to micromolar range of OHT (Fig. 4C).

To investigate whether the cellular context could influence the degree of agonist activity observed in the presence of OHT with the different mutants at position 351, we repeated our experiments in breast carcinoma MDA-MB-231 cells. Levels of OHT-induced activity were undetectable in MDA-MB-231 cells transfected with expression vectors for HEG0, HED351E, HED351V or HED351Y and the minimal ERE3-TATA promoter. When coactivator TIF2.1 was overexpressed in these cells, activity of HED351Y was clearly detectable in the presence of OHT. HEG0 and mutant HED351E were stimulated to lesser

degrees, and mutant HED351V was even more weakly active (Fig. 5). Thus, similar to what was observed in HeLa cells, removing the negative charge at position 351 did not increase the agonist activity of OHT in MDA-MB-231 cells.

The mutations at position 351 do not affect binding to estrogen or antiestrogens.

The absence of activity of the HED351G, HED351A and HED351V mutants with OHT could be due to defective antiestrogen binding. HeLa cells were incubated with increasing concentrations of OHT premixed with 0.3 nM E2. The resulting competition curves were similar for all receptors tested including HED351Y, suggesting that the relative affinity for OHT versus E2 was comparable in all mutants (Fig. 6A). Similar results were obtained with ICI182,780 (data not shown). We also performed *in vitro* hormone binding assays with wild-type and mutant receptors to assess whether ER mutants have a reduced affinity for estradiol. Results of these experiments indicate that neither of the D351A or D351Y mutations significantly affected estradiol binding (Fig. 6B). These results demonstrate that mutations at position 351 do not grossly perturb the structure of the ligand binding domain, and that the lower activity of mutants HED351G, HED351A and HED351V with OHT cannot be attributed to a low affinity for this antiestrogen.

Fig. 5 Transcriptional activity of ER mutants carrying hydrophobic mutations of D351 is low in MDA-MB-231 cells treated with OHT.

Expression vector for wild-type or mutant ERs (0.5 μg) were transiently transfected into MDA-MB-231 cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2 μg), the internal control vector CMV- βGal (2 μg) and pSG5 or pSG5-TIF-2.1 (2 μg), as indicated. CAT activity was measured in extracts from cells treated with estradiol (25 nM), OHT or ICI 182,780 (100 nM).

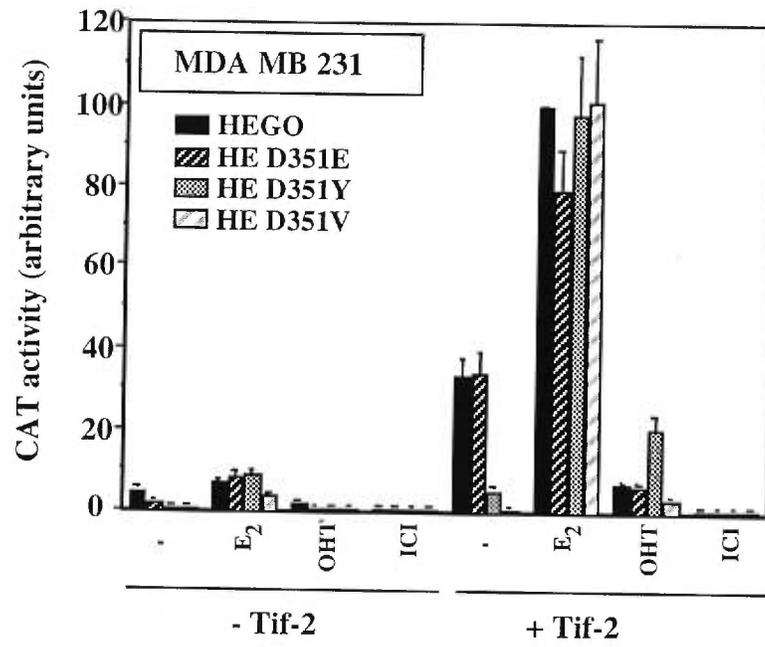
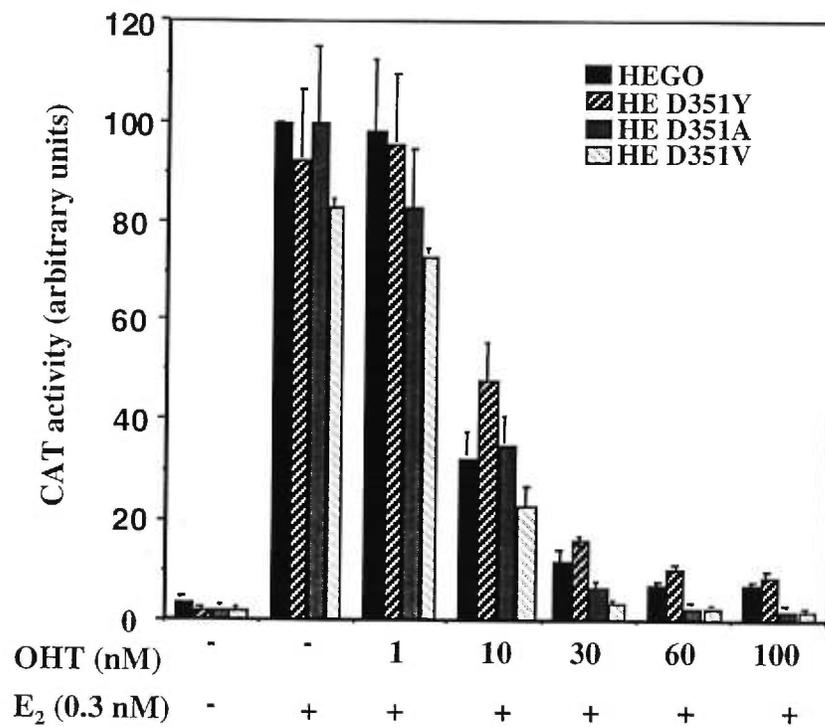


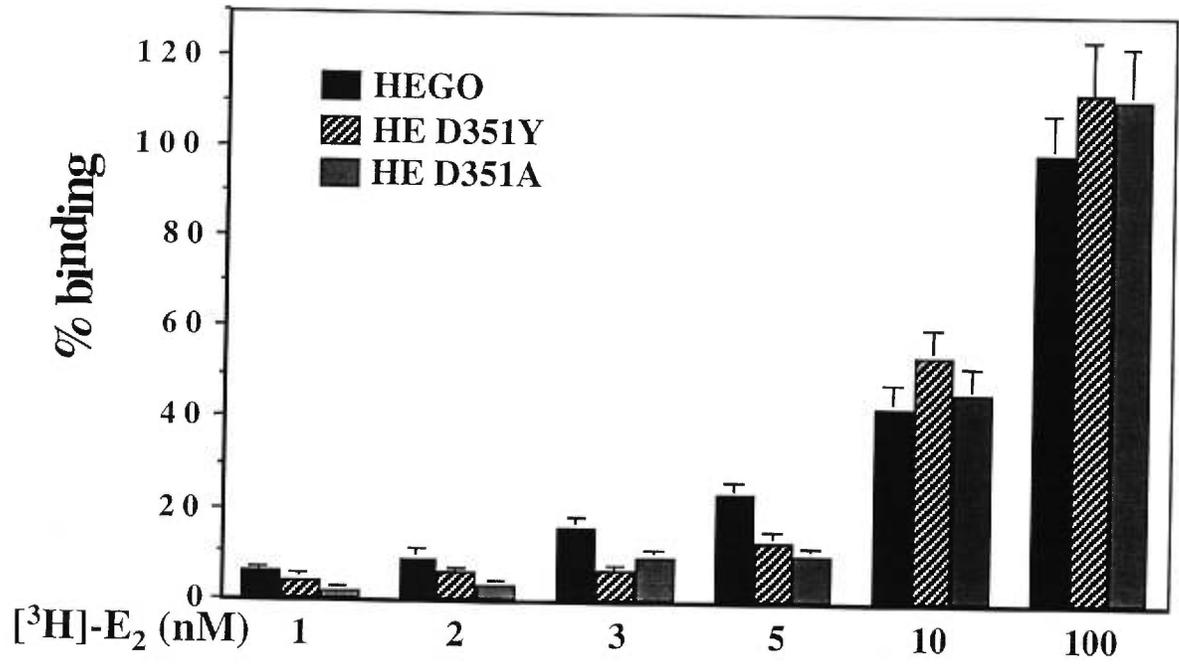
Fig. 6: Effect of mutations of D351 on estrogen and antiestrogen binding by ER α .

A. Expression vectors for wild-type or mutant ERs at position 351 (0.5 μ g) were transiently transfected into HeLa cells along with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2 μ g) and the internal control vector CMV- β Gal (2 μ g). CAT activity was measured in extracts from cells treated with 0.3 nM estradiol mixed with varying concentrations of OHT. **B.** Extracts from transiently transfected COS-7 cells were incubated at room temperature with varying concentrations of tritiated estradiol in the absence or the presence of 100x excess unlabeled hormone. Unbound hormone was removed by incubation with activated charcoal.

A)



B)



Suppression of the negative charge at position D351 destabilizes the active conformation of the ligand binding domain in the absence of hormone.

Although mutations D351G, D351A, D351V did not affect ER α function in the presence of estrogen, all inhibited its basal activity, even in the presence of overexpressed TIF2.1 (Figs 2, 4 and 5). These results are similar to the phenotype associated with a previously described mutation in the ER α ligand binding domain, G400V, which results in a receptor (HE0) with very low basal levels of activity due to diminished dimerization and DNA binding in the absence of hormone (31). We performed gel shift assays to compare the effect of the G400V and the D351A, D351Y, or D351E mutations on binding to the consensus ERE. Wild-type ER α and all D351 mutants bound to an estrogen response element with similar efficiency in the absence and in the presence of hormone (Fig. 7, compare lanes 5-12 to lanes 1-2). By comparison, ER mutant HE0 did not bind DNA in the absence of hormone (Fig. 7, compare lanes 3-4 to lanes 1-2). These results suggest that, contrary to mutation G400V, mutations at position 351 do not affect DNA binding and dimerization.

The absence of effect of the D351 mutations on ER ligand binding and DNA binding properties suggest that the removal of the negative charge at this position specifically affects transcriptional activity of ER α in the absence of added estrogen. To confirm that mutations at position D351 can repress transcriptional activity in the absence of hormone, we introduced mutation D351A in the HEY537A (34,35) and HEL536P (32) receptors, which are constitutively active ER α mutants that can recruit coactivators in the absence of hormone *in vitro* (33, 34, 35). While mutants HEY537A and HEL536P activated the ERE3-

Fig. 7: Effect of mutations of D351 on the DNA binding properties of ER α .

COS-7 cells were transiently transfected with 15 μ g of wild-type or mutant ER vectors. Whole cell extracts were prepared by three cycles of freeze-thawing and incubated with poly dI-dC for 20 min on ice. Estradiol (or vehicle) and labeled ERE were added for 30 min at 25⁰C and complexes were separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.

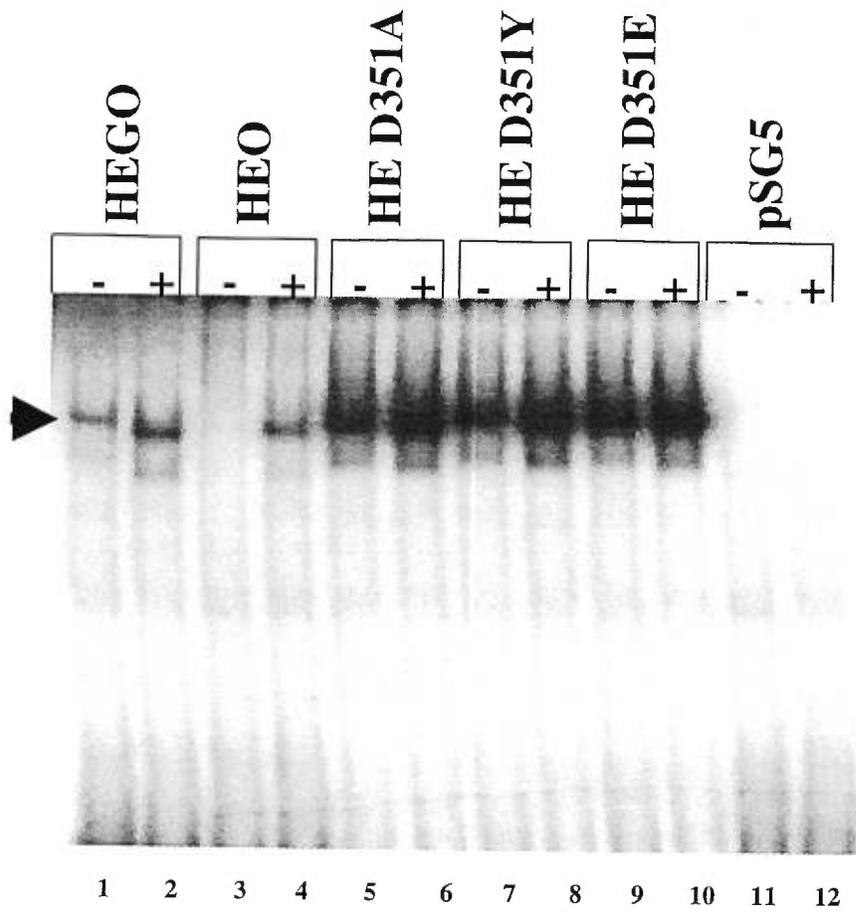
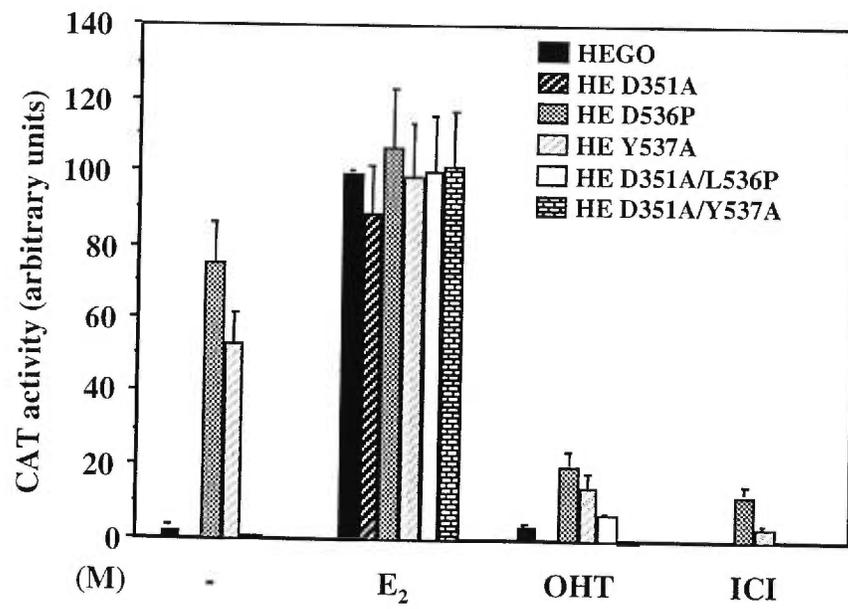


Fig. 8: Suppression of basal activity by mutations of D351 is due to destabilization of the active conformation of unliganded ER α .

Expression vectors for wild-type or mutant ERs (0.5 μ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2 μ g) and the internal control vector CMV-Gal (2 μ g). CAT activity was measured in extracts from cells treated with estradiol (25 nM), OHT or ICI 182,780 (100 nM).



TATA promoter both in the absence or the presence of estradiol, but not antiestrogens (Fig. 8), mutation of D351A abolished the high levels of basal activity observed with both constitutive receptors. In contrast, activity of the double mutants HED351A,L536P and HED351A,Y537A in the presence of estradiol was comparable that of their singly mutated counterparts (Fig. 8). These results confirm that D351 plays a role in the active conformation of ER α that is more important in the absence of hormone than in its presence.

DISCUSSION

The presence and precise length of the antiestrogen side chain has been correlated with their antagonist activity (39, 40). In human ER α , aspartate 351 interacts with the tertiary amine present at the end of the side chains of Tam and Ral (16, 23). We have investigated the precise role of this interaction in the pharmacology of partial antiestrogens. Hydrogen bonding between D351 and the side chain of partial antiestrogens could potentially contribute to the affinity of the ER α -antiestrogen complex. However, previous characterization of mutant D351Y indicated that the relative affinity for estradiol or for the antiestrogen tamoxifen was not affected by this mutation (41). Our experiments are consistent with this report and indicate that other mutations leading to replacement of D351 by G, A, or V did not noticeably affect the relative affinity of the corresponding receptors for estradiol and OHT in transiently transfected cells. It is likely that the hydrogen bonds formed by the hydroxyl group of OHT and the numerous hydrophobic interactions with the steroid-like skeleton and the side chain contribute most of the affinity of interaction between ER α and partial antiestrogens.

It has been suggested that amino acid D351 is key to the antiestrogenic character of partial antiestrogens (28). This conclusion was based on the observation that mutant D351Y has increased transcriptional activity in the presence of tamoxifen and raloxifene in breast cells MDA-MB-231. A possible role of the hydrogen bond formed by D351 may be to maintain the side chain of OHT or Ral in an antagonist position. Among the mutations tested at position 351, D351Y was unique in its capacity to yield a receptor that was stimulated by OHT and, to a lesser degree, by RU39,411 and Ral (data not shown), but not

by full antiestrogen ICI182,780. We speculate that a tyrosine at position 351 may destabilize the inactive conformation and/or stabilize a partially active structure of the ER LBD bound to partial antiestrogens. However, our results indicate that disruption of the hydrogen bond between D351 and the side chain of partial antiestrogens is not sufficient for this effect. Indeed, replacement of D351 by G, A, or V did not increase the agonist activity of partial antiestrogens in HeLa and in MDA-MB-231 cells, in the presence or absence of overexpressed TIF2.1, on either a minimal promoter (ERE3-TATA-CAT) or a more complex promoter (ERE3-tk-CAT, data not shown). Moreover, our results are consistent with the observation that the steroid analog RU486, which contains a tertiary amine-containing side-chain, is an antagonist not only for the progesterone receptor, which contains a glutamic acid at the position corresponding to D351 of ER α , but also with the glucocorticoid receptor, which contains a glycine instead (17).

We observed a marked reduction in the basal activity of the HED351G, HED351A, HED351V and HED351Y mutants, but not of HED351E. In contrast, estradiol-induced transactivation and TIF2.1 recruitment *in vitro* were not affected under the conditions of our assays. The DNA and estradiol binding properties of these receptors were not affected either. Introduction of mutation D351A in the constitutively active receptors HEL536P and HEY537A confirmed that abolition of the negative charge at position D351 inhibits folding of the unliganded receptor in an active conformation, while estradiol binding was sufficient to stabilize the active conformation in spite of the D351A mutation. Examination of the active structure of the ER α ligand binding domain reveals that D351 interacts with the amide of the peptidic bond between helix 12 amino acids L539 and L540 (16, 23). Accurate positioning of helix 12 is crucial for recruitment of coactivators that interact with nuclear

receptors through LXXLL motifs. We propose that positioning of helix 12 in the active conformation is unstable in the absence of hormone. In this model, disruption of the interaction between D351 and helix 12 would be sufficient to fully destabilize the active configuration in the unliganded receptor. On the other hand, the active conformation of helix 12 in the presence of estradiol is brought about by a network of intra- and intermolecular interactions, such that the contribution of D351 may be less important in the liganded receptor. The larger stimulation of wild-type ER α activity by TIF2.1 overexpression in the absence of hormone than in the presence of estradiol is consistent with a role of this coactivator in stabilizing the unstable active conformation of unliganded ER α LBD. Hydrophobic mutations of D351 fully blocked this positive effect of TIF2.1 on basal activity of ER α , supporting our hypothesis that D351 is important for the active structure of the unliganded ER LBD.

Previous studies with antiestrogen analogs have demonstrated the importance for the antagonist activity of antiestrogens of hydrogen bond acceptor groups at the position corresponding to the tertiary amine in OHT (42). In this light, our results that the hydrogen bond between D351 and the antiestrogen side chain can be disrupted without affecting antagonist activity are unexpected. We speculate that interaction of the antiestrogen side chain with D351 may prevent this amino acid from stabilizing an active conformation of the LBD in a manner similar to our observations with the unliganded receptor. Mutagenizing D351 to hydrophobic residues would prevent such a stabilizing role in addition to disrupting the hydrogen bond with the antiestrogen side chain, increasing the inhibitory effect of the side chain due to steric hindrance.

In conclusion, our data demonstrate that ER α mutants lacking the negative charge at amino acid D351 are efficiently repressed by partial antiestrogens. These results are not consistent with a crucial role of amino acid D351 in maintaining the side chain of OHT in an antagonist conformation, but are compatible with a role of the antiestrogen side chain in inhibiting a potential stabilizing effect of D351 on the active conformation of the ER LBD through a direct interaction involving the tertiary amine of this side chain.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Dr P. Chambon for the GST-TIF2 and TIF2.1 cDNAs and for monoclonal antibodies B10 and F3. We also thank Dr. J.H. White for critical reading of this manuscript.

REFERENCES

1. Green, S. and Chambon, P. (1988) *Trends in Genetics* **4**:309-14.
2. Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. and Chambon, P. (1989) *Cell* **59**:477-87.
3. Lees, J. A., Fawell, S. E. and Parker, M. G. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**:5477-5488.
4. Beato, M., Herrlich, P. and Schütz, G. (1995) *Cell* **83**:851-857.
5. Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S. and Tung, L. (1996) *Mol. Endo.* **10**:1167-1177.
6. Glass, C. K., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G. (1997) *Current Opinion in Cell Biology* **9**:222-232.
7. Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1995) *Science* **270**:1354-7.
Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.
8. Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokaawa, R., Gloss, B., Liin, S.-C., Heyman, R., Rose, D., Glass, C., Rosenfeld, M. (1996) *Cell* **85**:1-12.
9. Voegel, J. J., Heine, M., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1996) *EMBO J.* **15**:3667-3675.
10. Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L. and Stallcup, M.R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 4948-4945.
11. Anzick, S. L., Konomi, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X.-Y., Sauter, G., Kallionemi, O.-P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S. (1997) *Science* **277**:965-968.
12. Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L.

- Nakatani, Y. and Evans, R. M. (1997) *Cell* **190**:569-580.
13. Li, H., Gomes, P. J. and Chen, J. D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:8479-8484.
 14. Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) *Nature* **375**:377-382.
 15. Renaud, J.-P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) *Nature* **378**:681-689.
 16. Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. and Carlquist, M. (1997) *Nature* **389**:753-758.
 17. Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V. (1998) *Nature* **395**:137-143.
 18. Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L. and Berkenstam, A. (1998) *J. Biol. Chem* **273**:31108-31112.
 19. Williams, S. P. and Sigler, P. B. (1998) *Nature* **393**:392-6.
 20. Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**:87-94.
 21. Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apreletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. and Yamamoto, K. R. (1998) *Genes Dev.* **12**:3343-56.
 22. Feng, W., Ribeiro, R. C. J., Wagner, R. L., Nguyen, H. A. J.W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J. and West, B. L. (1998) *Science* **280**:1747-1749.
 23. Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P., Agard, P. J. and Greene, G. L. (1998) *Cell* **95**:927-937.

24. Mak, H. Y., Hoare, S., Henttu, P. M. A. and Parker, M. G. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**:3895-3903.
25. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G. (1997) *Nature* **387**:733-36.
26. Ding, X. F., Anderson, C. M., Ma, H., Hong, H., Uht, R. M., Kushner, P. J. and Stallcup, M. R. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**:302-313.
27. McInerney, E. M., Rose, D. W., Flynn, S. E., Westin, S., Mullen, T. M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolter, R. T., Assa-Munt, N., Milburn, M. V., Glass C. K. and Rosenfeld, M. G. (1998) *Genes Dev.* **12**:3357-68.
28. Levenson, A. S. and Jordan, V. C. (1997) *Cancer Res.* **58**:1872-5.
29. Wolf, D. M. and Jordan, V. C. (1994) *Breast Cancer Res. Treat.* **31**:129-138.
30. Wolf, D. M. and Jordan, V. C. (1994) *Breast Cancer Res. Treat.* **31**:117-127.
31. Tora, L., A. Mullick, D. Metzger, M. Ponglikitmongkol, I. Park and P. Chambon (1989) *EMBO J.* **8**:1981-6.
32. Eng, F.C.S., Lee, H.S., Ferrara, J. Willson, T.M. and White, J.H. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**:4644-4653.
33. Eng, F.C.S., Barsalou, A., Akutsu, N., Mercier, I., Zechel, C., Mader, S., and White J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 28731-28733.
34. White, R., Sjöberg, M., Kalkhoven, E. and Parker, M.G. (1997) *EMBO J.* **16**: 1427-1435.
35. Lazennec, G.Ediger, T.R., Petz, L.N., Nardulli, A.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**:1375-1386.
36. Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Tini, M. Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1998) *EMBO J.* **17**:507-519.

37. Barsalou, A., Gao, W. Anghel, S. I., Carriere, J. and S. Mader, S. (1998) *J. Biol. Chem.*
38. Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y. and Chambon, P. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:591-600.
39. Jordan, V.C. and Gosden, B. (1982) *Br. J. Pharmacol.* **57**:487-93.
40. Lednicer, D., Lyster, S. and Duncan G.W. (1967) *J. Med. Chem.***10**:78-86.
41. Catherino W.H., Douglas M.W. and Jordan V.C. (1997) *Mol. Endo.* **9**: 1053-1063
42. Robertson, D.W., Katzenellenbogen, J.A., Hayes, J.R. and Katzenellenbogen, B.S. (1982). *J. Med. Chem.* **25**: 167-171.

CHAPITRE III- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les anti-oestrogènes, rentrent en compétition avec le ligand naturel (E_2) pour la liaison au ER bloquant ainsi son effet de stimulation de l'activité transcriptionnelle. Les anti-oestrogènes sont classés en deux groupes: les anti-oestrogènes totaux et les anti-oestrogènes partiels. Ces derniers ont une activité agoniste partielle dans certains tissus et possèdent un effet antagoniste dans d'autres types de cellules (cellules mammaires). Le tamoxifène, l'anti-oestrogène le plus utilisé dans le traitement du cancer du sein, fait partie de cette dernière famille, tout comme le raloxifène. L'administration continue de Tam peut mener à une résistance à ce composé et parfois à une stimulation de la division et de la croissance des cellules mammaires par le Tam. Dans un système expérimental utilisant des tumeurs dérivées des cellules de carcinome mammaire MCF-7 et stimulées de manière continue par le Tam, Jordan et son groupe ont mis en évidence une mutation du ER dans laquelle l'acide aspartique en position 351 est remplacé par une tyrosine, D351Y (Gottardis et Jordan, 1988).

La structure cristallographique du domaine de liaison au ligand (LBD) du ER complexé au E_2 ou au Ral montre que le LBD est formé de plusieurs hélices α dans lesquelles les acides aminés polaires sont dirigés vers l'extérieur et les acides aminés hydrophobes forment une poche d'interaction avec l' E_2 . La fixation de l' E_2 dans cette poche hydrophobe permet un changement de conformation des hélices 3, 5 et 12, ce qui favorise la création d'une surface d'interaction pour les coactivateurs. Le squelette des anti-oestrogènes partiels participe à des interactions semblables à celles observées dans le cas du complexe LBD- E_2 . En revanche, la chaîne latérale des anti-oestrogènes qui est responsable de l'activité anti-oestrogénique provoque une conformation différente du LBD. Cette chaîne établit des contacts hydrophobes nouveaux ainsi qu'une liaison hydrogène impliquant l'acide aminé D351 et l'amine tertiaire trouvée dans la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels.

À l'aide de ces observations, il a été proposé que l'acide aminé D351 est la clef de l'effet antagoniste des anti-oestrogènes partiels (Levenson et Jordan, 1998). La perte de l'interaction entre l'acide aminé D351 et l'amine tertiaire de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels conférerait donc aux anti-oestrogènes partiels un effet agoniste.

Le but de mon projet de maîtrise était de comprendre l'importance de l'acide aminé D351 dans l'effet antagoniste des anti-oestrogènes partiels. Pour ce faire, j'ai introduit une série de mutations ponctuelles à la position 351 du ER α . La charge négative en position 351 a été supprimée par le remplacement de l'acide aspartique par des acides aminés hydrophobes comme A et V, par l'acide aminé polaire Y ou par un autre acide aminé chargé négativement, E et finalement par G qui permet de complètement abolir la chaîne latérale des acides aminés.

1- La mutation en position 351 ne change pas l'affinité relative du récepteur des oestrogènes pour les oestrogènes et les anti-oestrogènes

Le groupe de Jordan a démontré que le remplacement de l'acide aspartique en position 351 du ER α par une tyrosine ne change pas de manière drastique son affinité relative pour l'E₂ et le Tam (Catherino *et al.*, 1997). Mes résultats, en accord avec les résultats publiés, démontrent qu'il n'existe pas de différence notable dans l'affinité relative entre le récepteur sauvage et tous les mutants. Le pont hydrogène qui existe entre l'acide aminé D351 et la chaîne latérale des anti-oestrogènes n'est donc pas impliqué de façon majeure dans l'affinité pour le ligand. Il est probable que d'autres interactions polaires et hydrophobes entre le LBD et les anti-oestrogènes soient impliquées.

2- L'élimination de la charge négative en position 351 n'augmente pas l'effet agoniste des anti-oestrogènes

La structure du LBD en présence de E₂ ou des anti-oestrogènes ainsi que la découverte de la mutation D351Y dans une tumeur stimulée par Tam suggèrent un rôle de l'acide aminé D351 dans l'activité antagoniste des anti-oestrogènes partiels. Il est possible que le pont hydrogène formé entre l'acide aminé et l'amine tertiaire des anti-oestrogènes stabilise la chaîne latérale des anti-oestrogènes dans une conformation qui rend le récepteur transcriptionnellement inactif (Brzozowski *et al.*, 1997; Levenson *et al.*, 1997). Dans mes conditions expérimentales, seul le mutant D351Y est transcriptionnellement actif en

présence de Tam, RU 39, 411 et Ral. Aucun de ces mutants, en plus du récepteur sauvage, ne sont stimulés en présence d'un antagoniste total comme le ICI 182, 780. La perte du pont hydrogène entre l'acide aminé 351 et la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels n'est pas suffisante pour augmenter l'effet antagoniste des anti-oestrogènes partiels puisque la perte de cette interaction n'amène pas un gain d'activité transcriptionnelle en présence de Tam. Il est possible que le mutant D351Y forme des liens avec des acides aminés du LBD, ce qui stabiliserait une conformation active du complexe ER-anti-oestrogène partiel. On ne peut pas exclure l'hypothèse que la tyrosine puisse interagir directement avec des coactivateurs ce qui favoriserait le recrutement de ces derniers. Mes résultats sont en accord avec certaines observations qui démontrent que l'antiprogestine RU 486 lequel contient une amine tertiaire dans la chaîne latérale est un antagoniste autant pour le récepteur des progestérones, qui possède un acide glutamique en position analogue à l'acide aminé 351, que pour le récepteur des glucocorticoïdes, qui possède une glycine à cet endroit (Nolte *et al.*, 1998).

3- L'élimination de la charge négative en position 351 déstabilise la conformation active du récepteur des oestrogènes en absence d'hormone

La perte de la charge négative en position 351 diminue de beaucoup l'activité basale du ER. En effet, tous les mutants, à l'exception du mutant D351E, sont dépourvus d'une activité basale même dans le contexte d'une surexpression des coactivateurs comme le TIF 2.1. L'activité transcriptionnelle en présence d'oestrogène ainsi que le recrutement du coactivateur TIF 2.1 ne sont pas affectés dans ces conditions expérimentales. Il en va de même pour la liaison à l'ADN ainsi que la liaison de l'E₂. Aussi, l'introduction d'une mutation en position 351 dans le récepteur constitutivement actif HE L536P ou HE Y537A suffit pour supprimer cette activité constitutive mais n'affecte pas l'activité de ces récepteurs en présence de ligand. L'abolition de la charge négative en position 351 empêche donc le repliement du récepteur dans une conformation active en absence de ligand et la liaison de l'oestrogène stabilise une conformation active du récepteur.

Lorsqu'on analyse la structure active du LBD (en présence d'oestrogène) on observe que l'acide aminé 351 interagit avec le lien peptidique entre les acides aminés L 539 et L 540 de l'hélice 12 (Brzozowski *et al.*, 1997; Shiau *et al.*, 1998). Le positionnement de cette hélice est important pour le recrutement des coactivateurs qui interagissent, par leurs motifs LXXLL, avec l'hélice 12. Il est possible que l'absence d'hormone rende cette position instable. Il est donc concevable qu'une mutation en position 351 qui empêche cette interaction déstabilise la conformation active du récepteur. En présence d'oestrogène, le positionnement de l'hélice 12 est réalisé par une série d'interactions intra- et inter-moléculaires qui réduisent la contribution de l'acide aminé 351. La surexpression du coactivateur TIF 2.1 augmente largement l'activité basale du récepteur sauvage (et du mutant D351E) mais affecte en moindre mesure l'activité transcriptionnelle en présence d'oestrogène. De plus, une mutation en position 351 bloque totalement l'effet de la surexpression du TIF 2.1 sur l'activité basale mais n'affecte pas l'activité en présence d'oestrogène. Ces observations appuient notre hypothèse qui suggère une implication de l'acide aspartique dans la stabilisation d'une conformation active du récepteur en absence de ligand.

4- Hypothèse

La présence d'un bon accepteur d'hydrogène dans une position analogue à celle de l'amine tertiaire du Tam dans la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels (-OH ou -NR₂) est importante pour l'activité antagoniste des anti-oestrogènes partiels. Ce groupe accepteur peut former des liens hydrogène avec un acide aminé se trouvant dans le site de liaison au ligand (Robertson *et al.*, 1982). C'est pourquoi mes résultats sont inattendus. Il est possible que l'interaction de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels avec l'acide aminé D351 empêche ce dernier d'interagir avec le lien peptidique entre les acides aminés L 539 et L540 de l'hélice 12 ou d'établir d'autres interactions ayant comme effet de stabiliser une conformation active du récepteur. L'introduction des acides aminés hydrophobes en position 351 empêcherait selon cette hypothèse à la fois la stabilisation

d'une conformation active en plus de détruire le pont hydrogène avec la chaîne latérale, ce qui pourrait augmenter l'effet antagoniste de la chaîne latérale par encombrement stérique.

5- Perspectives

Mes résultats démontrent clairement que le pont hydrogène formé entre l'acide aspartique (charge négative) en position 351 du ER et l'amine tertiaire de la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels n'est pas crucial pour l'effet antagoniste des anti-oestrogènes dans plusieurs systèmes cellulaires. Il est possible que d'autres interactions entre la chaîne latérale et les acides aminés du récepteur soient impliquées dans la stabilisation de la chaîne latérale dans une position antagoniste. De plus, la structure du ER en présence des anti-oestrogènes partiels nous apprend qu'il existe toute une série d'interactions hydrophobes entre l'hélice trois du récepteur et la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels. Il serait donc intéressant de vérifier si ces interactions ne seraient pas impliquées dans l'effet antagoniste observé. Par une mutagenèse des acides aminés tels que L346, T347, L349, L354, on pourrait étudier l'influence de ces acides aminés sur l'affinité pour les anti-oestrogènes et l'activité antagoniste des anti-oestrogènes. Comme précédemment, leur affinité pour le ligand ainsi que pour l'élément de réponse seraient vérifiées dans des expériences de "hormone binding" et des expériences de retard sur gel. Leur activité transcriptionnelle serait mesurée dans des expériences de transfections stables ou transitoires sur différents promoteurs minimaux ou complexes dans des cellules tumorales comme les cellules MDA-MB-231, Ishikawa ER- et HeLa. L'utilisation des anti-oestrogènes partiels dans le traitement du cancer du sein peut provoquer, à long terme, l'apparition des tumeurs ovariennes. Mesurer l'activité transcriptionnelle de ces mutants dans une lignée cellulaire provenant d'une tumeur ovarienne, comme les cellules Ishikawa, et la comparer à l'activité obtenue dans d'autres lignées cellulaires provenant des tumeurs mammaires (cellules MDA-MB-231) permettra de comprendre la spécificité cellulaire du mécanisme d'activation par les anti-oestrogènes.

Un autre aspect intéressant serait de vérifier le mécanisme par lequel le mutant D351Y augmente l'activité agoniste des anti-oestrogènes. Il a été démontré que l'activité agoniste de ces anti-oestrogènes nécessite la présence de la fonction AF1 du récepteur sauvage (Gandini *et al.*, 1997, McInerney, Katzenellenbogen, 1996). Aussi, la fonction AF1 du ER serait constituée par deux régions d'environ 20 à 30 acides aminés appelés "domaine 1" et "domaine 2" (Gandini *et al.*, 1997). Il semble que le domaine 1 aurait la plus grande importance autant pour l'activité agoniste en présence des anti-oestrogènes partiels que pour l'interaction avec les coactivateurs de la famille p160 (Webb. *et al.* 1998). Il est possible que l'activité agoniste observée avec le mutant D351Y soit due à une activité AF2 augmentée ou à une nouvelle coopérativité entre les deux fonctions de transactivation. Je peux donc proposer d'étudier l'importance de chaque région de transactivation (AF1 et AF2) dans l'activité agoniste des anti-oestrogènes partiels. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par l'utilisation des mutants de la région AF1, introduits dans le contexte du mutant D351Y. Aussi on pourrait utiliser des mutants de TIF2 dans les différentes régions d'interaction avec le ER (Voegel *et al.*, 1998).

Le groupe de Katzenellenbogen a démontré que la présence d'un bon accepteur d'hydrogène dans la chaîne latérale des anti-oestrogènes partiels est importante pour l'activité antagoniste de ces anti-oestrogènes (Robertson *et al.*, 1982). En effet, des composés dérivés du Tam dans lesquels l'amine tertiaire a été remplacé par des groupements incapables de former des pont hydrogène ont perdu leur activité antagoniste dans l'utérus de rat. Il serait donc intéressant de tester si ces anti-oestrogènes ont une activité oestrogénique dans notre système cellulaire, les cellules HeLa. Si tel était le cas, je pourrais vérifier l'hypothèse selon laquelle la liaison au D351 est importante pour l'anti-oestrogénicité.

Ces expériences permettront une meilleure compréhension du mécanisme d'action des antiestrogènes partiels et aussi aideront énormément au design des nouvelles molécules ayant un effet anti-oestrogénique/oestrogénique tissus spécifique.

BIBLIOGRAPHIE

- Ali S, Metzger D, Bornert JM, Chambon P (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region, *EMBO J.*, **12**, 1153-1160
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kalioniemi OP, Trent JM, Meltzer PD (1997) AIB1 a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer, *Nature*, **277**, 965-968
- Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC (1994) Serine 167 is the major estradio-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor, *Mol. Endo.*, **8**, 1208-1214
- Bachmann-Moisson N, Barberi-Heyob M, Merlin J-L (1997) Aspects moléculaires des différents mécanismes de résistance au tamoxifène, *Bull. Cancer*, **84**, 1, 69-75
- Bagchi MK, Elliston JF, Tsai SY, Edwards DP, Tsai M-J, O'Malley BW (1988) Steroid Hormone-Dependent Interaction of Human Progesterone Receptor with its Target Enhancer Element, *Mol. Endo.*, **2**, 1221-1229
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J-A, Nilsson S (1998) Differential Response of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharma.*, **54**,1, 105-112
- Beatson GT (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinogen of the mammary: suggestion for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*,**2**, 104-107, 162-167
- Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley W (1993) Transcriptional Activation by the Estrogen Receptor Requires a Conformational Change in the Ligand Binding Domain, *Mol. Endo.*, **7**, 1266-1274

- Bezwooda WR (2000) c-erb-B2 expression and response to treatment in metastatic breast cancer, *Med Oncol*, **17**, 22-28
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen, *Embo J.*, **9**, 9, 2811-2818
- Bilimoria MM, Assikis VJ, Muezzner HD, Lurain JR, Jordan VC (1996) An analysis of tamoxifen-stimulated human carcinomas for mutations in the AF-2 region of the estrogen receptor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **58**, 479-488
- Bocchinfuso WP, Korach KS (1997) Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knock-out mice, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, **2**, 323-334
- Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson J-A, Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature*, **389**, 753-758
- Catherino WH et Jordan VC (1995) The biological action of cDNAs from mutated estrogen receptors transfected into breast cancer cells, *Cancer Letters*, **90**, 35-42
- Catherino WH, Wolf DM, Jordan VC (1995) A naturally occurring estrogen receptor mutation results in increased estrogenicity of a tamoxifen analog, *Mol. Endo*, **9**, 1053-1063
- Cavalliès V, Dauvois S, Danelian PS, Parker MG (1994) Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10009-10013

- Chander SK, McCague R, Lugmani Y, Newton C, Dowsett M, Jarman M, Coombes RC (1991) Pyrrolidino-4-iodotamoxifen and iodotamoxifen new analogues of the antiestrogen tamoxifen for the treatment of breast cancer, *Cancer Res.*, **51**, 5851-5858
- Cho H, Katzellenbogen BS (1993) Synergistic activation of estrogen receptor mediated transcription by estradiol and protein kinase activators, *Lon. Endo.*, **7**, 441-452
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us?, *Endocrine Reviews*, **20**, 358-417
- Curtis SW, Washburn T, Sewall C, diAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knock-out mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor, *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 12626-12630
- Danelian PS, White R, Hoare SA, Fawell SE, Parker MG (1993) Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen, *Mol. Endo.*, **7**, 232-240
- Dauvois S, Danielian PS, White R, Parker MG (1992) Antiestrogen ICI 164384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover, *Biochemistry*, **89**, 4037-4041
- Denis M, Poellinger L, Wikstrom A-C, Gustafsson J-A (1988) Requirements of hormone for thermal conversion of the glucocorticoid receptor to a DNA-binding state, *Nature*, **333**, 686-688

- Denton RR, Koszewski NJ, Notides AC (1992) Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequences on specific DNA binding, *J. Biol. Chem.*, **76**, 7263-7268
- Elliston JF, Klein-Hitpass L, Tsai SY, Tsai MJ, Parker MG, O'Malley BW (1990) Mechanism of estrogen receptor-dependent transcription in a cell-free system, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6607-6612
- El-Tanani MKK, Green CD (1997) Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor, *Mol. Endo.*, **11**, 928-937
- Eriksson MA, Nilsson L (1998) Structural and dynamic effects of point mutations in the recognition helix of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain, *Protein Eng.*, **11**, 589-600
- Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science*, **240**, 889-895
- Fraser RA, Heard DJ, Adam S, Lavigne AC, Le Douarin B, Tora L, Losson R, Rochette-Egly C, Chambon P (1998) The putative cofactor TIF1 α is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors, *J Biol Chem*, **273**, 16199-16204
- Freedman LP, Luisi BF, Korzsun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR (1988) The function of structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain, *Nature*, **334**, 543-546
- Fontana A, Delmas PD (1999) Estrogènes et antiestrogènes: action sur l'ostéoporose, *La Presse Médicale*, **28**, 555-558

Fuhrmann U, Parczyk K, Klotzbucher M, Klocker H, Cato ACB (1998) Recent developments in molecular action of antihormones, *J. Mol. Med.*, **76**, 512-524

Fujimoto N, Katzenellenbogen BS (1994) Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathway in breast cancer cells: Antiestrogens selectivity and promoter dependence, *Mol. Endo.*, **8**, 296-304

Fuqua SA, Fitzgerald SD, Chamness GC, Tandon AK, McDonnell, Nawaz Z, O'Malley BW, McGuire WL (1994) Variant human breast cancer tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity, *Cancer Res.*, **51**, 105-109

Gandini O, Kohno H, Curtis S, Korach KS (1997) Two transcription activation functions in the amino terminus of the mouse estrogen receptor that are affected by the carboxy terminus, *Steroids*, **62**, 508-515

Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (1997) Nuclear receptor coactivators, *Curr. Op. Cell. Biol.*, **9**, 222-232

Gottardis MM, Robinson SP, Satyaswaroop PG, Jordan VC (1988) Differential ability of antiestrogens to stimulate breast cancer cell (MCF-7) growth in vivo and in vitro, *Cancer Res.*, **49**, 4765-4769

Gottardis MM et Jordan VC (1988) Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogens administration, *Cancer Res.*, **48**, 5183-5187

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A, *Nature*, **320**, 134-139

Green S et Chambon P (1988) Nuclear receptor enhance our understanding of transcription regulation, *TIG*, **4**,309-314

Green S, Kumar V, Theulaz I, Wahli W, Chambon P (1988) The N-terminal DNA-binding zinc finger of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity, *EMBO J.*, **7**, 3037-3044

Green S, Chambon P (1989) Chimeric receptors used to probe the DNA-binding domain of the estrogen and glucocorticoid receptors, *Cancer Res*, **49**,2282s-2285s

Grese TA, Sluka JP, Bryant HU, Cullinan GJ, Glasebrook AL, Jones CD, Matsumoto K, Palkowitz AD, Sato M, Termine JD (1997) Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **93**, 11540-11545

Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature*, **389**, 349-352

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q1. *Science*, **250**, 1684-1689

Hanstein B, Eckner R, DiRenzo J, Halachmi S, Liu H, Searcy B, Kurokawa R, Brown M (1996) p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex, *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 11540-11545

Hassig CA, Fleischer TC, Billin AN, Schreiber SL, Ayer DE (1997) Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A, *Cell*, **8**, 341-347

- Hollenberg SM, Weinberg C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA, *Nature*, **318**, 635-641
- Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR (1996) GRIP-1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4948-4952
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takimoto GS, Tung L (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors, *Mol. Endo*, **10**, 1167-1177
- Howell A, Downey A, Anderson E (1996), New endocrine therapies for breast cancer, *Eur. J. Cancer*, **32A**, 576-588
- Howell T (1997) New endocrine agents, *Cancer Treat. Rev.*, **23**, S49-S57
- Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA, (1993) Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element, *Mol. Endo.*, **7**, 992-998
- Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1992) Members of the hormone receptor superfamily interact with TFIIB, *J. Biol. Chem.*, **267**, 17617-17623
- Iwase H, Omoto Y, Iwata H, Haia Y, Ando Y, Kobayashi S (1998) Genetic and Epigenetic Alteration of the Estrogen Receptor Gene and Hormone Independence in Human Breast Cancer, *Oncology*, **55**, supp.1, 11-16
- Jiang SY et Jordan CV (1992) Growth regulation of estrogen receptor negative

breast cancer cells transfected with cDNA for estrogen receptor, *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**, 580-591

Johnston SRD, Haynes BP, Smith IE, Jarman M, Sacks NPM, Ebbs SR, Dowsett M (1993) Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer and reduced intratumoral drug concentration, *Lancet*, **342**, 1521-1522

Jordan VC, Gosden B (1983) Inhibition of the uterotrophic activity of estrogens and antiestrogens by the short acting antiestrogens LY 117 018, *Endocrinology*, **113**, 463-468

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Liu SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors, *Cell*, **85**, 403-414

Kangas L, Meiminen A-L, Blanco G, Gronroos M, Kallilo S, Karjalainen A, Perilla M, Sodervall M, Tiiovola R (1986) A new triphenylethylene compound Fc-1157AII antitumor effects, *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **17**, 109-113

Karnik PS, Kulkarni S, Liu X-P, Budd GT, Bukowski RM (1994) Estrogen receptor mutations in tamoxifen resistant breast cancer, *Cancer Res.*, **54**, 349-353

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase, *Science*, **270**, 1491-1494

Kato S, Kitamoto T, Masuhiro Y, Yanagisawa J (1998) , Molecular mechanism of a cross-talk between estrogen and growth-factor signaling pathways , *Oncology*, **55**,

supp.1, 5-10

Katzenellenbogen BS, Korach KS (1997), A New Actor in the Estrogen Receptor Drama-Enter ER- β , *Endocrinology*, **138**, 3, 861-62

Kingsley-Kallesen ML, Kelly D, Rizzino A.J (1999), Transcriptional regulation of the transforming growth factor-beta2 promoter by cAMP-responsive element-binding protein (CREB) and activating transcription factor-1 (ATF-1) is modulated by protein kinases and the coactivators p300 and CREB-binding protein, *Biol. Chem.*, **274**, 34020-34028

Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NL, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai MJ, O'Malley BW (1990) The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex, *Cell*, **60**, 247-257

Koike S, Sakai M, Muramatsu M (1987) Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA, *Nucleic Acids Res*, **15**, 2499-2513

Kraus WL, Weis KE, Katzenellenbogen BS (1995) Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transactivation activity by agonist-and antagonist-occupied progesterone receptor, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1847-1857

Kraus WL, Weis KE, Katzenellenbogen BS (1997) Determinants for the repression of estrogen receptor transcriptional activity by ligand-occupied progesterone receptors, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **63**, 175-88

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of

mice lacking estrogen receptor beta, *Proc Nat Acad Sci USA*, **95**, 15677-15682

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Bornert JM, Chambon P (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erb-A and the human oestrogen and glucocorticoid receptors, *EMBO J*, **5**, 891-897

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12, 5925-30

Kuiper GGJM, Gustafsson JA (1997) The novel estrogen receptor- β subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens, *FEBS Letters*, **410**, 87-90

Kuo M-H, Allis CD (1998) Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation, *Bioessays*, **20**, 615-626

Lahooti H, White R, Danielian PS, Parker MG (1994) Characterization of ligand-dependent phosphorylation of the estrogen receptor, *Mol. Endo.*, **8**, 182-188

Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor, *J. Bio. Chem.*, **269**, 4458-4466

Levenson AS, Catherino WH, Jordan VC (1997) Estrogenic activity for an antiestrogen by a natural mutation of the estrogen receptor, *J. Steroid Mol. Biol.*, **60**, 261-68

Levenson AS et Jordan VC (1998) The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (aspartate) in the estrogen receptor, *Cancer Res.*, **58**, 1872-1875

- Lindzey J, Westel WC, Couse JF, Stoker T, Cooper R, Korach KS (1998) Effects of castration and chronic steroid treatments on hypothalamic gonadotropins-releasing hormone content and pituitary gonadotropins in male wild-type and estrogen receptor alpha knock-out mice, *Endocrinology*, **139**, 4092-4101
- Lose R, Seibel K, Eppenberger U (1985) No loss of estrogenic and antiestrogenic activity after demethylation of droloxifene, *Int. J. Cancer*, **36**, 701-703
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993) Alternation of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 11162-11166
- Lucibello FC, Slater EP, Jooss KU, Beato M, Muller R (1990) Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in fos which is absent in fos B, *EMBO J.*, **9**, 2827-2834
- MacGregor JI, Jordan VC (1998) Basic Guid to the Mechanisms of Antiestrogens Action, *Pharmacological Rev.*, **50**, 151-196
- Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element *Nature*, **338**, 271-4
- Mader S, Chambon P, White JH (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain, *Nuc. Acids Res.*, **21**, 1125-1132
- Mahfoudi A, Roulet E, Dauvois S, Parker MG, Wahli W (1995) Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to pure antagonists,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 4206-4210

Mak HY, Hoare S, Henttu PM, Parker MG (1999) Molecular determinants of the estrogen-coactivator interference, *Mol. Cell. Bio.*, **19**, 5, 3895-3903

Makin HLJ (1984) *Biochemistry of Steroid Hormones*, 2^e édition, Blackwell scientific Publication, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne, 208-212

McInerney EM, Katzenellenbogen BS (1996) Different Regions in Activation Function-1 of the Human Estrogen Receptor Required for Antiestrogen- and Estradiol-dependent Transcription Activation, *J. Biol. Chem.*, **271**, 39, 24172-24178

Messina M, Messina V (2000) Soyfoods, soybean isoflavones: A brief overview, *J. Ren. Nutr.*, **2**, 63-68

Metzger D, Ali S, Bornert J-M, Chambon P (1995) Characterisation of the Amino-terminal Transcriptional Activation function of the Human Estrogen receptor in Animal and Yeast Cells, *J. Biol. Chem.*, **270**, 16, 9535-9542

Meyer ME, Quirin-Stricker C, Lerouge T, Bocquel MT, Gronmeyer H, (1992) A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10882-10887

Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS (1995) The carboxyterminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists, *Mol. Endo.*, **9**, 814-825

Montano MM, Ekena K, Krueger KD, Keller AL, Katzenellenbogen BS (1996)

Human estrogen receptor ligand activity inversion mutants: receptors that interpret antiestrogens as estrogens and estrogens as antiestrogens and discriminate among different antiestrogens, *Mol. Endo.*, **10**, 230-242

Mori H (1998) Preface. *Oncology*, **55**, suppl.1, 1

Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor, *FEBS Letters*, **392**, 49-53

Murphy LC, Leygue E, Dotzlaw H, Douglas D, Coutts A, Watson PH (1997) Oestrogen receptor variants and mutations in human breast cancer, *Ann. Med.*, **9**, 3, 221-234

Nichols M, Rientjes JMJ, Stewart AF (1998) Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists, *Embo J.*, **17**, 3, 765-773

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *Nature*, **395**, 137-143

O'Brien CA, Liskamp RM, Solomon DH, Weinstein IB (1985) Inhibition of protein kinase C by tamoxifen, *Cancer Res.*, **55**, 1780-1786

Ogata E (1998) Overview, *Oncology*, **55**, suppl.1, 1

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M (1998) The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and Its Heterodimerization with ER α in Vivo and in Vitro, *Biochem. Biophysical*

Res. Comm., **243**, 122-126

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases, *Cell*, **87**, 953-959

Onate SA, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily, *Science*, **270**, 1354-1357

Onate SA, Boonyaratanakornkit V, Spencer TE, Tsai SY, tsai M-J, Edwards DP, O'Malley BW (1998) The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors, *J. Biol. Chem.*, **273**, 12101-12108

Osborne CK, Coronado EB, Wiebe VJ, De Gregorio M (1991) Acquired tamoxifen resistance: correlation with reduced tumor levels of tamoxifen and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen, *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 1477-1482

Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, Scanlan T (1997) Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP1 Sites, *Science*, **277**, 1508-1510

Pakdel F, Le Guellec C, le Roux MG, Valotaire Y (1989) Identification and estrogen induction of two estrogen receptors (ER) messenger ribonucleic acids in the rainbow trout liver: sequence homology with other ERs, *Mol. Endo.*, **3**, 44-51

Pakdel F et Katzenellenbogen BS (1992) Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination, *J. Biol. Chem.*, **267**, 3429-3437

Pan LC, Ke HZ, Simmons HA, Crawford DT, ChidseyFrink KL, McCurdy SP, Schafer JR, Kimboro KS, Taki M, Korach KS (1997) Estrogen receptor alpha-knock-out (ERKO) mice lose trabecular and cortical bone following ovariectomy, *J. Bone Miner. Res.*, **12**, 126

Paranjabe SM, Kamakaka RT, Kadonaga JT (1994) Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 265-297

Pazin MJ, Kadonaga JT (1997) What's up and down with histone deacetylation and transcription?, *Cell*, **89**, 325-328

Pike ACW, Brozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell A-G, Engstrom JL, Gustafsson J-A, Carlquist M (1999) Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and full antagonist, *EMBO J.*, **18**, 17, 4608-4618

Ram PT, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown GM, Hill SM (1998) Estrogen receptor transactivation in the MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors, *Mol. Cell. Endo.*, **141**, 53-64

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P (1995) Pharmacology, Churchill Livingstone Inc., New York, 11-13

Rao GS (1981) Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells, *Mol. Cell Endo.*, **21**, 97-108

Renaud J-P, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-

trans retinoic acid, *Nature*, **378**, 681-689

Robertson DW, Katzenellenbogen JA, Hayes JR, Katzenellenbogen BS (1982), Antiestrogen basicity--activity relationships: a comparison of the estrogen receptor binding and antiuterotrophic potencies of several analogues of (Z)-1,2-diphenyl-1-[4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl]-1-butene (tamoxifen, Nolvadex) having altered basicity, *J. Med. Chem.*, **25**, 167-171

Roby D, Wolffe AP, Wahli W (2000) Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks, *Mol. Endo.*, **14**, 329-347

Ross JS, Fletcher JA (1999) HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer, *Am J Clin Pathol*, **112**, S53-67

Saarto T, Blomquist C, Ehnholm C, Taskinen MR, Elomaa I (1996) Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: A randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid level in postmenopausal women with node-positive breast cancer trial, *Acta Oncol.*, **31**, 271-274

Sadovsky Y, Webb P, Lopez G, Baxter JD, Fitzpatrick PM, Giznag-Ginsberg E, Cavailles V, Parker MG, Kushner PJ (1995) Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein, *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1554-1563

Schwabe JWR, Champan L, Finch JT, Rhodes D (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements, *Cell*, **75**, 567-578

Schwartz JA, Brooks SC (1998) Changes in the structure of the ligand or substitution to AF residues in the estrogen receptor make independent contributions

- to coactivator sensitivity by SRC-1, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **67**, 3, 223-232
- Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG (1997) Role of estrogen receptor alpha in the anterior pituitary gland, *Mol Endo.*, **11**, 674-681
- Shemshedini L, Ji JW, Brou C, Chambon P, Gronenmeyer H (1992) In vitro activity of the transcription activation functions of the progesterone receptor. Evidence for intermediary factors. *J. Biol. Chem.* **267**, 1834-1839
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL (1998) The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen, *Cell*, **95**, 927-937
- Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1997) Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **52**, 141-165
- Smith CL, Onate SA, Tsai M-J, O'Malley BW (1996) CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **17**, 8884-8888
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by mutation in the estrogen receptor gene in man, *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1056-1061
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, Allis CD, Zhou J, Mizzen CA, McKenna NJ, Onate SA, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase, *Nature*, **389**, 194-198

- Srivastava RA, Srivastava N, Averna M, Lin RC, Korach KS, Lubahn DB, Schonfeld G (1997) Estrogen up-regulates apolipoprotein E gene expression by increasing Apo E mRNA in the translating pool via estrogen receptor alpha mediated pathway, *J. Biol. Chem.*, **272**, 33360-33366
- Stewart HJ, Stern PH (1986) Effects of antiestrogens, tamoxifen and clomiphene on bone resorption in vitro, *Endocrinology*, **118**, 125-131
- Suzuki M, Yagi N (1994) DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12357-12361
- Takeshita A, Yen PM, Misiti S, Cardona GR, Liu Y, Chin WW (1996) Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator, *Endocrinology*, **137**, 3594-3597
- Tominaga T, Kitamura M, Saito T, Itoh I, Takikawa H (1981) Comparative histochemical and biochemical assays of estrogen receptors in breast cancer patients, *Gann*, **72**, 60-65
- Tonetti DA, Jordan VC (1997) Mutations in Tamoxifen-Stimulated Breast Cancer, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **62**, 2/3, 119-128
- Tora L, Mullick A, Metzger D, Ponglikitmongkol M, Park I, Chambon P (1989) The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties, *EMBO J.*, **8**, 1981-1986
- Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses, *Cur. Op. Cell. Biol.*, **10**, 373-383
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert GJ, Jenkins NA, Labrie F,

- Giguère V (1997) Cloning, Chromosomal Localization, and Functional Analysis of the Murine Estrogen Receptor β , *Mol. Endo*, **11**, 3, 353-364
- Treuter E, Albrektsen T, Johansson L, Leers J, Gustaffson JA (1998) A regulatory role for Rip140 in nuclear receptor activation, *Mol Endo*, **12**, 864-881
- Tsai M-J, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 451-486
- Umesco K et Evans RM (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors, *Cell*, **57**, 1139-1146
- Van de Velde P, Nique F, Planchon P, Prevost G, Bremaud J, Hameau MC, Magnien V, Philibert D, Teutsch G (1996) RU 58688: Further in vitro and in vivo pharmacological data related to its antitumoral activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **59**, 449-457
- Van Holde K, Zlatanova J (1996) Chromatin architectural proteins and transcription factors: a structural connection, *Bioessay*, **18**, 697-700
- Voet D, Voet JG (1990) Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc, 1^{ère} édition, chapitre V, 771-1066
- Vogel JJ, Heine MJ, Tini M, Vivat V, Chambon P, Gronenmeyer H (1998) The coactivator Tif-2 contains three nuclear binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and independent pathways, *EMBO J.*, **17**, 507-519
- Wakeling AE et Bowler J (1988) Novel antiestrogens without partial agonist activity, *J. Steroid Biochem.*, **31**, 645-653

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jetsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**, 7889-7893

Webb P, Lopez GN, Uht RM, Kushner PJ (1995) Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens, *Mol. Endo.*, **9**, 443-456

Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang S-M, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ (1998) Estrogen Receptor Activation Function 1 Works by Binding p160 Coactivator Proteins, *Mol. Endo.*, **12**, 1605-1618

Weigel NL (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation, *Biochem. J.*, **319**, 657-667

White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M (1987) Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor, *Mol. Endo.*, **1**, 735-744

Wolf DM et Jordan VC (1994) The estrogen receptor from a tamoxifen stimulated MCF-7 tumor variant contains a point mutation in the ligand binding domain, *Breast Cancer Res. Treat.*, **31**, 129-138

Zangh X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK (1998) A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist occupied steroid hormone receptor, *Mol Endo*, **12**, 513-524

Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A et Carlstedt-Duke J (1992) Determinant for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem*, **267**, 24941-24947

Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A, Wright APH (1994) Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4175-4179

Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A (1995) Structural Determinants of DNA-Binding Specificity by Steroid Receptors, *Mol. Endo.*, **9**, 389-400