

2 mil. 2931.7

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Effets des Antiestrogènes sur le Niveau de Récepteur des Estrogènes dans la Cellule :  
Implication de la Dégradation via la Voie du Protéasome

par

Véronique Perly

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

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

octobre 2001

© Véronique Perly, 2001



W  
H

158

2002

N.021

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

*Effets des Antiestrogènes sur le Niveau de Récepteur des Estrogènes dans la Cellule :*  
*Implication de la Dégradation via la Voie du Protéasome*

Présenté par  
Véronique Perly

est évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Dr. Muriel Aubry

Membres : Dr. Luc Desgroseillers

Dr. Sylvie Mader

## SOMMAIRE

Le cancer du sein est un des cancers les plus fréquents chez la femme. L'implication du récepteur des estrogènes (ER) est connue depuis longtemps, et l'hormonothérapie est une des armes utilisées pour lutter efficacement contre la maladie. Le Tamoxifène (Tam) est un antiestrogène partiel couramment utilisé comme traitement adjuvant. Cependant un traitement à long terme provoque une augmentation de l'incidence des cancers endométriaux. D'autres antiestrogènes, tels que le Raloxifène présentement en étude clinique, semblent être dépourvus de ces effets indésirables. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces antiestrogènes facilitera la mise au point de nouveaux antiestrogènes dépourvus d'effets secondaires tels que les effets utéro-trophiques.

ER est un facteur de transcription qui appartient à la famille des récepteurs stéroïdiens. La liaison du ligand amène sa dimérisation, puis la liaison à un élément de réponse et l'activation des gènes cibles en amont. Une voie de régulation de l'activité estrogénique passe par le contrôle du niveau de récepteur dans la cellule. Or, il est prouvé que la liaison de ER à son ligand naturel, l'estrogène ( $E_2$ ), l'entraîne dans une voie de protéolyse rapide et ciblée : la voie du protéasome (Lonard et al., 2000)(Nawaz et al., 1999). Ceci implique l'ubiquitination préalable de ER $\alpha$  (Wijayaratne & McDonnell, 2001).

En présence d'antiestrogènes totaux, ER disparaît des extraits cellulaires (Wijayaratne & McDonnell, 2001)(Borras et al., 1996)(El Khissiin & Leclercq, 1999). Il a été cependant

suggéré que ER ne serait pas dégradé mais agrégé dans la région périnucléaire, et donc absent de l'extrait cellulaire soluble (Devin-Leclerc et al., 1998). Tam en revanche stabilise ER (Borras et al., 1996). Le but de ma maîtrise est de comprendre le mécanisme qui gouverne la disparition de ER en présence d'antiestrogènes totaux et partiels. Nous nous sommes penchés en particulier sur les différences de stabilité de ER $\alpha$  en présence d'antiestrogènes partiels tels que le Tamoxifène et le Raloxifène.

Pour ce faire, nous avons regardé l'effet de divers antiestrogènes sur la concentration de ER $\alpha$  dans les extraits cellulaires après expression transitoire dans différentes lignées cellulaires. Nous avons démontré que différents antiestrogènes ont un impact variable sur la stabilité du ER attribuable directement à la liaison au récepteur, et que ces effets sont histospécifiques. Nous n'avons pas observé de corrélation directe entre les niveaux d'activité transcriptionnelle du récepteur et sa dégradation. En revanche, nos résultats suggèrent que la liaison des différents ligands provoque un changement conformationnel, notamment au niveau de l'hélice H12 qui serait responsable de la stabilité du récepteur. Enfin, des expériences de mutation ponctuelle sur des lysines dans l'environnement de l'hélice H12 nous démontrent l'implication de certaines lysines (en particulier la lysine 531) dans la dégradation de ER par différents ligands. Il se peut qu'il s'agisse d'effets conformationnels ou que les lysines soient des substrats directs des ubiquitine-protéines ligases. Ainsi, nous avons montré que les changements conformationnels induits par les différents ligands de ER modulent probablement sa stabilité.

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>II</b>
<b>INDEX DES TABLES</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XII</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>18</b>
.1 CANCERS DU SEIN : .....	19
.1.1 <i>Généralités</i> .....	19
.1.2 <i>Implication du récepteur des estrogènes</i> .....	20
.1.3 <i>Traitements actuels</i> .....	21
.1.4 <i>Résistance au Tamoxifène</i> .....	22
.2 FAMILLE DES RÉCEPTEURS STÉROÏDIENS : .....	23
.2.1 <i>Membres de la famille</i> .....	23
.2.2 <i>Structure générale</i> .....	24
.2.3 <i>Récepteurs aux estrogènes <math>\alpha</math> et <math>\beta</math></i> .....	27
.3 FONCTIONNEMENT DU RÉCEPTEUR AUX ESTROGÈNES : .....	29
.3.1 <i>Hsp 90</i> .....	29
.3.2 <i>Élément de réponse aux estrogènes</i> .....	30
.3.3 <i>Interaction entre AF-1 et AF-2, activation de la transcription</i> .....	31
.3.4 <i>Gènes cibles</i> .....	34
.3.5 <i>Souris « knock-out »</i> .....	35
.4 LIGANDS DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES : .....	36

.4.1	<i>Agonistes</i> : .....	39
.4.2	<i>Antagonistes partiels ou SERMs (type I) : Tam, Ral, RUp, LY117018</i> .....	39
.4.3	<i>Antagonistes totaux (type II) : ICI182,780, RUt</i> .....	42
.5	INTERACTION DU RÉCEPTEUR AVEC LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GÉNÉRAUX, ET LES COFACTEURS : .....	43
.5.1	<i>Machinerie Transcriptionnelle Générale</i> .....	43
.5.2	<i>Coactivateurs</i> .....	44
.5.3	<i>Corépresseurs</i> .....	46
.6	MODULATION DE LA RÉPONSE AGONISTE DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES : .....	47
.6.1	<i>Facteurs de croissance : facteurs extérieurs</i> .....	47
.6.2	<i>Phosphorylation</i> .....	48
.6.3	<i>Voie AP-1</i> .....	49
.6.4	<i>Modification de la structure de la chromatine</i> .....	50
.6.5	<i>Conformation du récepteur : Structure cristallographique et modélisation</i> .....	51
.6.6	<i>Niveau de ER dans la cellule</i> .....	60
.7	EFFETS DU PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION AU SEIN DES CELLULES : .....	61
.8	DÉGRADATION DU RÉCEPTEUR DES ESTROGÈNES VIA LA VOIE DU PROTÉASOME.....	63
.8.1	<i>Signaux d'ubiquitination</i> .....	64
.8.2	<i>Ubiquitination</i> .....	65
.8.3	<i>Classes d'Ubiquitine-ligases</i> .....	68
.8.4	<i>Le Protéasome</i> .....	71
.8.5	<i>Régulation spécifique</i> .....	74
.9	MODULATION DE LA STABILITÉ DE ER .....	75
.9.1	<i>Turn-over</i> .....	75
.9.2	<i>En présence d'estrogènes</i> .....	76
.9.3	<i>En présence d'antiestrogènes partiels</i> .....	78

.9.4	<i>En présence d'antiestrogènes totaux</i> .....	78
.9.5	<i>ER<math>\beta</math></i> .....	81
.10	INFLUENCE DU LIGAND SUR LA LOCALISATION DU RÉCEPTEUR DANS LA CELLULE.....	82
	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>83</b>
	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>86</b>
.1	CONSTRUCTIONS.....	87
.1.1	<i>Mutagenèse Dirigée par PCR</i> .....	87
.1.2	<i>Préparation du Vecteur pSG5-HEG0</i> .....	92
.1.3	<i>Préparation de l'Insert</i> .....	94
.1.4	<i>Ligation et Sélection des Clones Positifs</i> .....	95
.2	CULTURE CELLULAIRE.....	96
.2.1	<i>Cellules HeLa</i> .....	96
.2.2	<i>Cellules Cos-7</i> .....	96
.2.3	<i>Cellules Ishikawa</i> .....	97
.2.4	<i>Cellules MCF-7</i> .....	97
.3	TRANSFECTION DES CELLULES.....	98
.4	TRAITEMENT DES CELLULES.....	99
.5	EXTRACTION DES PROTÉINES.....	99
.6	ELECTROPHORÈSE ET TRANSFERT DES PROTÉINES.....	100
.6.1	<i>Electrophorèse des Protéines</i> .....	100
.6.2	<i>Électrotransfert des Protéines sur Membrane</i> .....	100
.6.3	<i>Le Buvarpage de Type Western</i> .....	101
.6.4	<i>Immunoblots anti-ER</i> .....	102
.7	ESSAIS CAT.....	102
.7.1	<i>Extraction des Protéines</i> .....	102

.7.2	<i>Dosage Colorimétrique <math>\beta</math> Galactosidase</i> .....	103
.7.3	<i>Essais Enzymatiques CAT (Chloramphénicol acétyltansférase)</i> .....	103
<b>RÉSULTATS</b> .....		<b>105</b>
.1	EFFET DES LIGANDS DE ER SUR LA QUANTITÉ DE RÉCEPTEUR PRÉSENTE DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES TOTAUX.....	106
.2	LA MODULATION DE LA QUANTITÉ DE ER $\alpha$ PAR LES ANTIESTROGÈNES EST SPÉCIFIQUE AU TYPE CELLULAIRE. ....	107
.3	LA DISPARITION DE ER $\alpha$ DE L'EXTRAIT CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE RAL SUIT UNE CINÉTIQUE RAPIDE. ....	111
.4	LA DÉGRADATION PROTÉASOMALE EST IMPLIQUÉE DANS LA DISPARITION DE ER $\alpha$ INDUITE PAR LE RALOXIFÈNE DANS LES CELLULES HELA. ....	113
.5	LA RÉGION EF EST NÉCESSAIRE ET SUFFISANTE POUR OBSERVER UNE DISPARITION DU RÉCEPTEUR. ....	116
.5.1	<i>La Modulation de la Stabilité du Récepteur induite par le Ligand requiert la Présence du Domaine de Liaison au Ligand</i> .....	116
.5.2	<i>La Région EF de ER n'est pas Stable lorsqu'elle n'est pas Complexée à un Ligand</i> .....	118
.5.3	<i>La Perte de Récepteur induite par la Fixation du Raloxifène est Tributaire de la Présence des Régions AB et C</i> .....	120
.6	LA DISPARITION DE ER EST INDÉPENDANTE DES MODIFICATIONS DE L' ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE INDUITES PAR LES DIFFÉRENTS LIGANDS.....	120
.6.1	<i>La Liaison à Un ERE n'affecte Pas la Stabilité de ER<math>\alpha</math></i> .....	120
.6.2	<i>Le Recrutement Accru de Coactivateurs ne modifie pas les Activités de Dégradation de ER<math>\alpha</math></i>	123
.6.3	<i>Absence de Corrélation entre l'Activité Transcriptionnelle de ER et sa Dégradation</i> .....	124
.7	LA POSITION DE L'HÉLICE H12 DÉTERMINE LA STABILITÉ DU RÉCEPTEUR. ....	127

.7.1	<i>La Délétion de l'Hélice H12 Stabilise ER<math>\alpha</math> sans Discrimination pour les Différents Ligands.</i>	127
.7.2	<i>Les Mutations dans la Région de l'Hélice H12 Affectent la Déstabilisation Ligand Dépendante de ER<math>\alpha</math>.</i>	129
.8	LES LYSINES 529 ET 531 SONT IMPLIQUÉES DANS LA DÉGRADATION DE ER INDUITE PAR LES ESTROGÈNES ET ANTIESTROGÈNES.	135
.9	DÉGRADATION VERSUS AGRÉGATION DU RÉCEPTEUR EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS LIGANDS.	136
	<b>DISCUSSION</b>	<b>140</b>
.1	EFFETS DES ESTROGÈNES ET ANTIESTROGÈNES SUR LES NIVEAUX DE ER DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES TOTAUX	141
.1.1	<i>Modulation des Niveaux de ER<math>\alpha</math> par les Ligands.</i>	141
.1.2	<i>La Dégradation de ER induite par les Ligands est Spécifique du Type Cellulaire.</i>	142
.1.3	<i>Absence de Corrélation entre les Niveaux de ER et l'Activité Transcriptionnelle.</i>	144
.2	LA DÉGRADATION DE ER INDUITE PAR RAL EMPRUNTE LA VOIE PROTÉASOMALE	146
.2.1	<i>MGI32 inhibe la Dégradation de ER Induite par Ral.</i>	146
.2.2	<i>Les Ligands de ER n'induisent pas la Formation d'Agrégats Insolubles.</i>	147
.3	DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LA DÉGRADATION DE ER	149
.3.1	<i>La Région LBD de ER est Nécessaire à la Dégradation du Récepteur.</i>	149
.3.2	<i>La Région de l'Hélice H12 est Importante pour l'Effet des Ligands sur les Niveaux de ER</i>	150
.3.3	<i>La Lysine 531 est-elle impliquée dans la Dégradation Protéasomale de ER?</i>	152
	<b>CONCLUSION</b>	<b>154</b>
	<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>157</b>
	<b>ANNEXE</b>	<b>186</b>

## INDEX DES TABLES

<b>Table 1</b> : Séquence des oligonucléotides.....	
---	--

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : Structure de ER.....	19.
<b>Figure 2</b> : Structure des ligands de ER.....	34
<b>Figure 3</b> : Structure cristallographique du LBD de ER lié à E <sub>2</sub> .....	45
<b>Figure 4</b> : Structure cristallographique de ER-LBD lié à Ral.....	48
<b>Figure 5</b> : Structure du LBD de ER lié à E <sub>2</sub> .....	50
<b>Figure 6</b> : Structure du LBD de ER lié à Tam.....	51
<b>Figure 7</b> : Structure du LBD de ER lié à Ral.....	52
<b>Figure 8</b> : Ubiquitination d'un substrat.....	62
<b>Figure 9</b> : Structure du protéasome.....	67
<b>Figure 10</b> : Mutagenèse dirigée par PCR.....	84
<b>Figure 11</b> : Carte du vecteur pSG5-HEG0.....	85
<b>Figure 12</b> : La disparition de ER des extraits cellulaires induite par les estrogènes ou antiestrogènes dépend du contexte cellulaire.....	101
<b>Figure 13</b> : La disparition de ER $\alpha$ induite par le Raloxifène suit une cinétique rapide.....	105
<b>Figure 14</b> : La dégradation protéasomale est impliquée dans la diminution de la quantité de ER $\alpha$ induite par Ral.....	107
<b>Figure 15</b> : La modulation de la quantité de ER induite par les ligands dépend de la présence du LBD.....	110

- Figure 16** : La modulation de la quantité de ER induite par Ral dépend de la présence de la région AB.....112
- Figure 17** : La présence d'un ERE ou de coactivateurs n'affectent pas la dégradation de ER.....116
- Figure 18** : L'activité transcriptionnelle de ER ne corrèle pas avec sa dégradation.....119
- Figure 19** : La région de l'hélice H12 est déterminante pour la stabilité de ER.....124
- Figure 20** : La mutation des acides aminés 543-544 et 362 modifie la stabilité de ER induite par ses ligands.....126
- Figure 21** : Les mutations K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R n'affectent pas la stabilité de ER.....128
- Figure 22** : Les mutants K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R se comportent tous comme ER $\alpha$  en transactivation.....129
- Figure 23** : Les lysines 529 et 531 sont impliquées dans la dégradation de ER.....130

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	Alanine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	Fonction d'activation 1
AF-2	Fonction d'activation 2
AhR	Aryl hydrocarbons
AIB-1	Amplified in breast cancer 1
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activating protein 1
APC	Anaphase promoting complex
AR	Récepteur des androgènes
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BRCA-1	Breast cancer gene 1
BRCA-2	Breast cancer gene 2
C	Cystéine
CAT	Chloramphenicol acetyltransférase
CBP	Creb binding protein
CHX	Cycloheximide

COS-1	Green african monkey fibroblast, ER-
CREB	cAMP response element binding protein
D	Acide aspartique
DES	Diéthylbestrol
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
E	Acide glutamique
E <sub>2</sub>	17 β estradiol
EGF	Epidermal growth factor
ER $\alpha$ , ER $\beta$	Récepteur des estrogènes $\alpha$ et $\beta$
ER+	Tumeur (lignée cellulaire) exprimant le récepteur des estrogènes
ER-	Tumeur (lignée cellulaire) ayant un niveau non détectable de
ER	Récepteur des estrogènes
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
$\alpha$ ERKO	Souris knock-out ER $\alpha$
$\beta$ ERKO	Souris knock-out ER $\beta$
FBS	Fetal bovine serum
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux Glucocorticoïdes
GRIP-1	Glucocorticoid receptor-interacting protein 1
GW	GW273
HAT	Histone acétyltransférase

HBD	Domaine de liaison à l'hormone
HEGO	Vecteur codant pour le récepteur des estrogènes $\alpha$
HeLa	Human cervix adenocarcinoma, ER-
HRE	Élement de réponse aux hormones
ICI	ICI182,780
IGF 1	Insuline-like growth factor 1
Ishikawa	Endometrial adenocarcinoma, ER+
L	Leucine
LBD	Domaine de liaison du ligand
M	Methionine
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Human mammary gland adenocarcinoma, ER+
MOR	Mouse estrogen receptor
NcoR	Nuclear receptor corepressor
NID	Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires
OHT	4-hydroxytamoxifène
P	proline
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PRE	Élement de réponse à la progestérone

Pu	Purine
R	Arginine
Ral	Raloxifène
RAR	Récepteur de l'acide « all trans » rétinolique
RIP 140	Receptor interacting protein 140
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
RUp	RU39,411
RUt	RU58,668
RXR	Récepteur de l'acide 9-cis rétinolique
SERMs	Selective estrogens receptors modulators
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- $\alpha$	transforming growth factor- $\alpha$

TIF-2	Transcription intermediary factor -2
TR	Récepteur de l'hormone thyroïdienne
V	Valine
VDR	Récepteur de la vitamine D <sub>3</sub>
Y	Tyrosine
Zn	Zinc

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier le Dr Sylvie Mader de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Elle a su me faire profiter de sa rigueur scientifique et de son expérience. Elle m'a aidée à améliorer ma démarche scientifique, et fait profiter de sa passion pour la science.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai travaillées dans le laboratoire : Denis, pour nos conversations à la paillasse, et Samuel pour ses conseils précieux et ses blagues pince-sans-rire.

Je remercie tout particulièrement mes trois acolytes, Guila, Walter et Silvia, qui ont su être des amis plus que des collègues. Tant nos discussions scientifiques que nos parties de rire m'ont beaucoup apporté tout au long de ma maîtrise. Ils m'ont encouragée, soutenue et aidée à chaque fois que j'en ai eu besoin, et surtout depuis ma grossesse et la naissance de ma fille.

Merci également à ma fille Guila (4 mois) pour avoir animé mes nuits et rythmé mes jours pendant la rédaction de ce mémoire. Et enfin merci à mon mari, Tony, pour avoir été mon plus fervent supporter tout au long de ma maîtrise.

## INTRODUCTION

## .1 Cancers du sein :

### *.1.1 Généralités*

De nos jours, de plus en plus de femmes souffrent de cancers du sein. Ce type de cancer, le plus fréquent chez les femmes, représente 50% des cancers féminins avant 50 ans et 20% des cancers chez la femme de plus de 75 ans. On peut dire aujourd'hui qu'une femme sur neuf souffrira d'un cancer du sein au cours de sa vie. L'incidence annuelle et la fréquence (2% chaque année) de ce cancer ne cessent d'augmenter d'où la nécessité d'améliorer les traitements (Bachmann-Moisson et al., 1997).

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle dont on ne maîtrise malheureusement pas l'augmentation dans les populations occidentales. Si certaines populations de femmes sont dites à risque, les autres groupes restent malgré tout susceptibles de le développer.

Les risques familiaux sont à considérer très sérieusement. En effet, une femme dont une parente au 1<sup>er</sup> degré a déjà souffert d'un cancer du sein voit son risque relatif d'en être atteinte également multiplié par trois. Cette constatation met en lumière le caractère héréditaire de cette affection. D'ailleurs, les femmes possédant une mutation de leur gène BRCA-1 ou BRCA-2 (Breast Cancer Gene 1) ont 85% de chance de contracter cette maladie (Bachmann-Moisson et al., 1997).

Ces gènes agissent comme des suppresseurs de tumeur dont la mutation prédispose l'individu au cancer du sein : il s'agit de gènes de susceptibilité au cancer du sein (Futreal et al., 1994)(Miki et al., 1994). Cependant, les cancers héréditaires ne représentent qu'une minorité des cancers du sein.

La puberté précoce, une première grossesse tardive, la primiparité, les cycles anovulatoires, l'absence d'allaitement ou une ménopause tardive sont autant de facteurs de risque ayant comme caractéristique commune une augmentation relative du taux d'estrogènes. Le risque à court terme est augmenté à chaque grossesse, reflétant les effets mitotiques d'un environnement riche en estrogènes.

Le risque environnemental est de plus en plus considéré. En effet pesticides et engrais contiennent des molécules capables d'être métabolisées en analogue d'estrogènes. De plus, des estrogènes naturels, les phytoestrogènes sont présents dans la nature (Clarke et al., 1996). La forme physique générale de l'individu pourrait également avoir un impact sur le développement de carcinomes mammaires. Par exemple, l'obésité est souvent associée à une augmentation de la production des estrones par les adipocytes (Enger et al., 2000).

### *.1.2 Implication du récepteur des estrogènes*

Les premières preuves d'un lien existant entre les estrogènes et la croissance des cancers du sein nous viennent d'un médecin anglais, Beatson qui découvrit qu'en

ovariectomisant des femmes préménoposées, il voyait la régression de tumeurs mammaires avancées (Beatson GT, 1896). Plus tard, en 1900, une étude de Stanley Boyd établissait qu'un tiers des patientes ayant un cancer du sein qui avait été ovariectomisées voyait leur maladie régresser. Les ovaires étant le siège principal de la production d'estrogènes, on soupçonna alors les tumeurs mammaires d'être hormonodépendantes. Ce n'est que 60 ans plus tard que le mécanisme responsable de ces phénomènes fut approfondi. Une association entre cancer du sein et concentration en estrogènes du sérum chez les femmes postménoposées fut établi (Toniolo et al., 1995)(Zeleniuch-Jacquotte et al., 1995).

Dans les années 80, le récepteur des estrogènes est isolé et cloné par l'équipe de Chambon (Walter et al., 1985), ouvrant ainsi la voie du design de molécules utilisables dans le cadre d'une hormonothérapie : les antiestrogènes.

### *.1.3 Traitements actuels*

Les traitements des cancers du sein montrent de très bons résultats avec 80% de survie (chiffres émis par Santé Canada en 2000). L'ablation mammaire reste le moyen le plus efficace de lutter contre la prolifération de la tumeur et des métastases. Elle est généralement accompagnée d'un traitement de chimiothérapie et d'hormonothérapie (Chlebowski & McTiernan 1999)(Chlebowski et al., 1999)(Lam & Chlebowski 2000)(Watabe et al., 1969).

La prolifération et la survie de certaines tumeurs mammaires nécessitent la présence d'estrogènes (Ogata, 1998). Ces tumeurs répondent à l'hormonothérapie et représentent 70% des tumeurs mammaires. Elles possèdent un niveau détectable de ER (récepteur des estrogènes) et sont dites ER+ (Iwase et al., 1998). L'antiestrogène le plus couramment utilisé comme traitement adjuvant est le Tamoxifène (Tam.) (Lam & Chlebowski 2000). Les estrogènes vont donc agir en se fixant à ER, événement qui va provoquer la liaison à l'ADN sur des éléments de réponse aux estrogènes ou EREs, et entraîner l'activation de la transcription de gènes cibles en aval impliqués dans la prolifération cellulaire.

#### *.1.4 Résistance au Tamoxifène*

Une certaine proportion de ces tumeurs devient résistante aux traitements par les antiestrogènes (Brunner et al., 1997)(Clarke et al., 1996). Certaines tumeurs deviennent même dépendantes des antiestrogènes (Ogata, 1998). Pourquoi? L'hypothèse la plus avancée à l'heure actuelle est que des mutations spontanées apparaîtraient dans des oncogènes, comme dans le récepteur des estrogènes (ER), dans les tumeurs ER+. Cet avantage sélectif permettrait au récepteur mutant de prendre le dessus par rapport au récepteur sauvage (Iwase, Omoto et al., 1998). De plus, le type de ER semble également être important : l'expression de ER de type  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) dans les tumeurs ER+ semble mieux corrélée avec une réponse aux antiestrogènes et un bon pronostic que celle de ER de type  $\beta$  (ER $\beta$ ).

Des protéines kinases pourraient également produire une activation ligand indépendante de ER via sa phosphorylation et contribuer ainsi à la résistance endocrine (Ali et al., 1993).

## .2 Famille des récepteurs stéroïdiens :

### *.2.1 Membres de la famille*

Le récepteur des estrogènes appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. De structure très proche, ils agissent tous selon le même mode. La fixation de leur ligand, une hormone stéroïdienne va permettre l'activation de la transcription de gènes cibles après liaison à un élément de réponse propre à l'hormone. Cette superfamille comprend le récepteur aux estrogènes (ER), à la progestérone (PR), à la vitamine D (VDR), aux glucocorticoïdes (GR), aux hormones thyroïdiennes (TR), à l'acide rétinoïque all trans et 9-cis (RAR/RXR) et à l'ecdysone. (Bachmann-Moisson et al., 1997)(Kato 1998)(Parker, 1993). Les hormones synthétisées par des cellules endocrines (surrénales et gonades) se dirigent vers leurs cellules cibles en passant par le flot sanguin. Elles y entrent par diffusion simple ou facilitée, et y seront disponibles pour lier leur récepteur spécifique.

Les récepteurs stéroïdiens sont donc des facteurs de transcription se trouvant majoritairement sous forme libre et inactive dans le cytoplasme (cas de GR) (Picard et

al., 1990) ou dans le cytoplasme et le noyau (les autres). La fixation du ligand entraîne un changement de conformation important. Ce changement de conformation provoque la translocation de GR dans le noyau (Biola & Pallardy, 2000)(Parker, 1993) et pour tous la fixation du complexe hormone-récepteur à un élément de réponse à l'hormone (HRE) présent dans le promoteur en amont du gène cible en *cis*. Les hormones stéroïdiennes peuvent également réguler l'expression d'un gène en affectant la stabilité de son ARNm et l'efficacité de sa traduction (Parker, 1993)(Piva et al. 1989)(Rouayrenc et al., 2000).

## .2.2 Structure générale

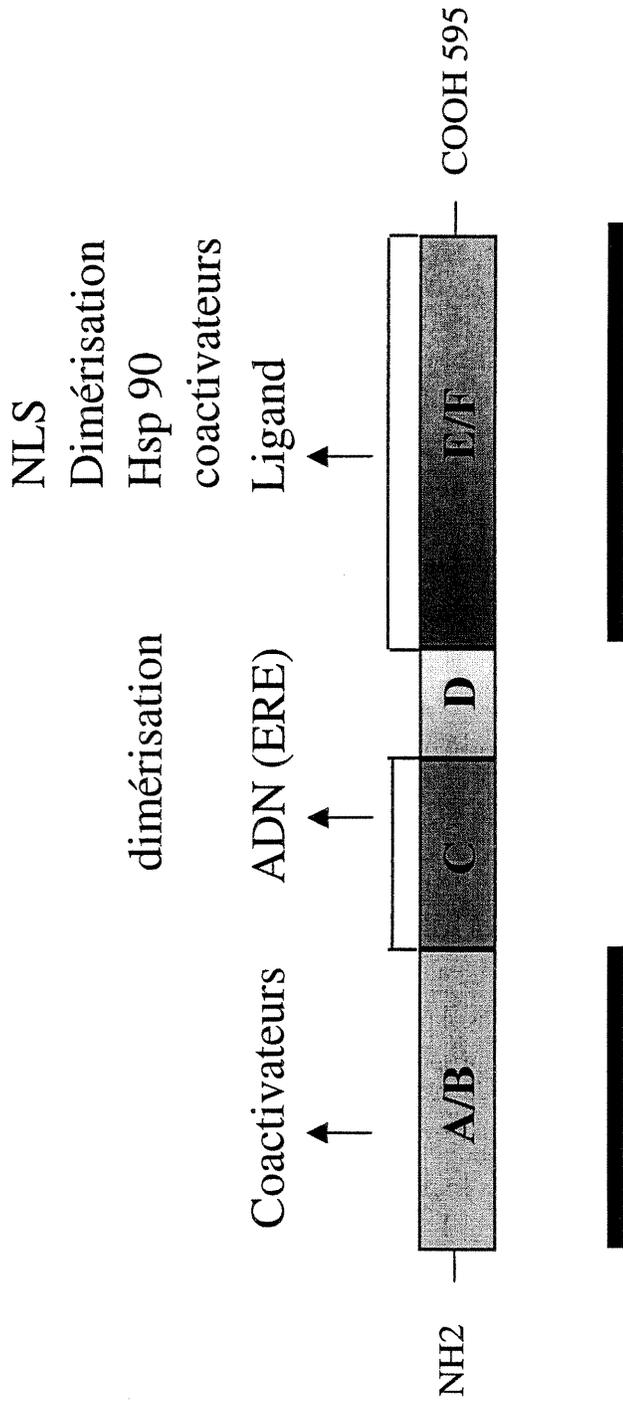
Les identités de séquence ainsi que des études de mutations à l'intérieur des différents récepteurs de cette superfamille ont permis de déterminer six régions notées de A à F chez ces récepteurs (Kumar et al., 1987).

Le récepteur des estrogènes humain qui appartient à cette famille, a été cloné et séquencé à partir de cellules MCF-7, qui sont des cellules humaines de cancer du sein (Kumar et al., 1987)(Green et al., 1986). ER est une protéine de 595 acides aminés, qui possède un poids moléculaire de 66 kDa (Green et al. 1986). Le récepteur des estrogènes humain est localisé sur le chromosome 6q et ER de la souris sur le chromosome 10 (Jordan et al., 1980) Il possède 6 domaines fonctionnels transcrits à partir de 8 exons (Fig.1).

**Fig.1 : Structure de ER**

ER est composé de 6 domaines fonctionnels notés de A à F. Le domaine de liaison à l'ADN ou DNA Binding Domain (DBD) va se lier à un élément de réponse aux estrogènes (ERE). Il est flanqué de 2 fonctions d'activation respectivement AF-1 et AF-2. L'activation de AF-1 est cellule et promoteur spécifique. AF-2 contient le domaine de liaison à l'hormone ou Hormone Binding Domain (HBD), et la surface de recrutement des cofacteurs.

Fig.1



**AF-1**

**(Fonction d'activation 1)  
histospécifique et  
promoteur spécifique**

**AF-2**

**(Fonction d'activation 2)  
dépendante du ligand**

Deux de ces domaines fonctionnels sont très conservés au niveau de leur séquence primaire chez les différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Un de ces domaines, le domaine de liaison à l'ADN ou DNA Binding Domain (DBD) (DBD), contient deux doigts de Zinc en C4 qui médient la liaison du récepteur à son ERE. Il se situe au niveau de la région C. C'est la région la plus conservée. Elle est responsable de la spécificité de la liaison et de l'orientation de la dimérisation pour les récepteurs hétérodimériques. La région D est une région qui permet l'indépendance fonctionnelle des régions C et E. Il contient une série d'acides aminés basiques conservée dans tous les récepteurs stéroïdiens. Ce domaine pourrait être également impliqué dans la localisation nucléaire du récepteur ainsi que dans la liaison à l'ADN.

Le DBD est flanqué de deux fonctions d'activation, respectivement la fonction d'activation 1 (AF-1) dans les régions A et B, et la fonction d'activation 2 (AF-2) dans les régions E et F.

La région A/B n'est pas très conservée au sein des différentes espèces, tant au niveau de sa séquence que de sa longueur. La fonction AF-1 est hormono-indépendante, et promoteur et cellule spécifique. Il se peut qu'elle soit impliquée dans l'effet agoniste du Tamoxifène (Green et al., 1986)(Metzger et al., 1995).

Le domaine E contient le domaine de liaison du ligand ou Ligand Binding Domain (LBD) (Montano et al., 1995), une fonction de dimérisation dépendante de la liaison du ligand ainsi qu'une fonction de transactivation (AF-2) aussi dépendante de la liaison du ligand. Ce domaine est hautement conservé parmi les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. De plus, il serait responsable de la dimérisation par des séquences

riches en leucine formant des structures «coil-coiled »et de la localisation nucléaire et contiendrait des séquences d'interaction avec les « Heat Shock Proteins ».

Le domaine F à l'extrémité C-terminale semble être impliqué dans une fonction de modulation spécifique de la réponse transcriptionnelle en présence d'estrogènes et d'antiestrogènes (Montano et al., 1995). Cette fonction serait influencée par le contexte cellulaire. La région F varie beaucoup d'un type de récepteur à l'autre (Parker 1993)(Parker et al., 1993)

### *.2.3 Récepteurs aux estrogènes $\alpha$ et $\beta$*

Récemment, un nouveau membre de la famille des récepteurs nucléaires a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de prostate de rat. Cette nouvelle séquence code pour une protéine de 485 résidus, et son poids moléculaire est de 54,2 kDa. ER $\beta$  possède une identité de séquence substantielle avec ER $\alpha$ , et tout particulièrement au niveau de son DBD (95%) et de son HBD (55%). ER $\alpha$  et ER $\beta$  possèdent un DBD pratiquement identique (la différence est d'un acide aminé), ce qui suggère qu'ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent interagir avec des éléments de réponse aux estrogènes identiques. ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont des homologues fonctionnels ; ils se lient tous deux aux estrogènes avec une grande affinité (Kuiper et al., 1996)(Kuiper & Gustafsson, 1997). Cette homologie fonctionnelle a été mise en évidence en mesurant l'activité transcriptionnelle de ER $\beta$  dans un système créé pour tester l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . En effet, ER $\beta$  active la transcription du

gène de la vitellogénine A2 qui contient un ERE dans son promoteur, en présence et en absence d'estrogène, même si cette activation est trois fois moindre par rapport à celle de ER $\alpha$  (Kuiper et al., 1996). Cependant, leurs domaines A/B ainsi que leurs fonctions d'activation AF-1 sont très différentes ce qui suggère que l'activation transcriptionnelle des gènes sous le contrôle des estrogènes peut être différente (Katzenellenbogen & Korach 1997)(Kuiper et al., 1996). L'homologue murin de ER  $\alpha$  a été cloné et cartographié sur le chromosome 12, un an plus tard.

L'existence de deux types de ER élargit de beaucoup le potentiel de régulation physiologique des estrogènes. La réponse à un stimulus estrogénique peut être différente en fonction de la composition en ER de la cellule cible. La variation de cette composition en ER résulte en un ratio différent de formes homo/hétérodimériques. Cette différence peut amener une réponse cellulaire tissu et cellule spécifique aux estrogènes et aux antiestrogènes (Kuiper & Gustafsson 1997)

En présence de tamoxifène (Tam), de 4-hydroxytamoxifène (OHT) et de raloxifène (Ral), ER $\alpha$  possède une activité agoniste partielle tandis que ER  $\beta$  montre une activité antagoniste pure sur un promoteur contenant des éléments ERE (Kuiper et al., 1996).

On sait que ER peut aussi réguler la transcription à partir d'un promoteur contenant un élément AP1. Ce type de transactivation, appelée "*voie alternative*", dépend de la présence de facteurs de transcription Jun et Fos. Lorsqu'on co-transfecte ER $\alpha$  et un gène rapporteur sous le contrôle d'un élément AP1, on observe une stimulation de la transcription tant en présence d'estrogènes qu'en présence d'antiestrogènes. Par contre en présence de ER $\beta$ , dans les cellules ER- et ER+, on observe une inhibition de la

transcription en présence d'estrogènes et une activation de la transcription en présence d'antiestrogènes. La pharmacologie des ligands de ER semble être renversée en présence d'un élément AP1 (Kuiper et al., 1996)(Saunders, 1998).

ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont une localisation tissulaire différente. Chez le rat (mais aussi chez l'humain) certains tissus comme le rein contiennent exclusivement du ER $\alpha$ . Dans d'autres tissus comme l'utérus et l'épididyme, ER $\alpha$  est prédominant et enfin, les ovaires, la prostate et le cerveau montrent une prédominance de ER $\beta$  (Katzenellenbogen & Korach 1997).

### .3 Fonctionnement du récepteur aux estrogènes :

#### .3.1 *Hsp 90*

En absence de ligand, ER se trouve majoritairement dans le noyau. Il est capable de transloquer entre le noyau et le cytoplasme. On peut trouver ER libre dans le cytoplasme sous forme d'un complexe hétéro-oligomérique (8s-9s), qui inclut entre autre la protéine de choc thermique Hsp90. C'est la seule protéine du complexe qui possède la capacité intrinsèque de sélectionner le récepteur (Catelli et al., 1985)(Catelli et al., 1999)(Joab et al., 1984)(Kang et al., 1994)(Kuiper et al., 1996)(Ruh & Toft 1984). Les molécules chaperonnes Hsp90 sont ubiquistes, majoritairement cytoplasmiques mais se retrouvent aussi en faible quantité dans le noyau (Meng et al., 1996). Hsp90 semble jouer un double

rôle dans la régulation de l'activité des récepteurs stéroïdiens : Hsp90 aide au maintien du récepteur dans une forme inactive en absence de ligand, l'empêche de se lier à son ERE, et assure une réponse hormonale efficace. En absence d'hormones, Hsp90 est capable de cotransloquer dans le noyau avec ER. Cela implique que ER soit au moins en partie associé à Hsp90 en absence d'hormones et qu'il se dissocie après la liaison du ligand. La dissociation de Hsp90 après traitement par des estrogènes ou antiestrogènes a été mise en évidence *in vivo* grâce à des essais de translocation nucléaire par le groupe de Catelli (Devin-Leclerc et al., 1998).

Une fois ER lié à son hormone, il va se dimériser puis se lier à un élément de réponse.

### .3.2 *Élément de réponse aux estrogènes*

Les régions C des récepteurs nucléaires de la même famille sont très conservées. Les séquences d'ADN qu'ils reconnaissent doivent donc se ressembler beaucoup.

Le récepteur des estrogènes lie l'ADN sous forme d'homodimère et reconnaît un élément de réponse palindromique espacé de trois nucléotides PuGGTCAnnnTGACCPu. ER se lie à l'ADN par son domaine C. Ce domaine, très conservé, est composé de 66 acides aminés. Il est très riche en cystéine, arginine et lysine. Le domaine DBD est composé de deux atomes de zinc coordonnés par huit résidus cystéine. On peut diviser le DBD en deux sous-domaines (CI et CII), chacun étant composé d'un motif doigt de Zn-hélice  $\alpha$ -région étendue. Le doigt de Zn contient

l'atome de Zn coordonné par quatre cystéines. L'hélice  $\alpha$  commence entre la troisième et la quatrième cystéine du doigt de Zn et se poursuit par la région étendue. Ces deux sous-domaines se plient dans une structure très compacte. Les deux hélices  $\alpha$  se retrouvent alors perpendiculaires l'une à l'autre et les résidus hydrophobes forment le noyau hydrophobe du DBD.

Des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence le rôle de résidus spécifiques situés dans le domaine de liaison à l'ADN de ER dans la reconnaissance des paires de bases dans chaque motif.

Le doigt de Zinc CI en N-terminal détermine la spécificité de reconnaissance du récepteur pour son HRE. Un ER chimérique dans lequel le doigt CI a été remplacé par la région correspondante de GR n'active plus un gène rapporteur contenant un ERE mais active un GRE. De plus, des mutations dans cette région ont permis de démontrer que les acides aminés 203, 204, et 207 étaient nécessaires et suffisants pour que ER soit capable de faire la discrimination entre un ERE et un GRE (Mader et al., 1989)(Mader et al., 1993).

### *.3.3 Interaction entre AF-1 et AF-2, activation de la transcription*

La fonction AF-1 se situe dans la partie N- terminale du récepteur dans la région A/B. Cette fonction est cellule et promoteur spécifique 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 (McInerney & Katzenellenbogen, 1996). La fonction AF-1 est hormono-indépendante et elle est formée par un domaine hydrophobe riche en proline situé entre les acides aminés 51 et 149 (Metzger et al., 1995).

La fonction de transactivation AF-2 se situe dans le domaine de liaison du ligand (LBD) en position C-terminale de ER. Le sillon formé par les hélices 3, 4, 5 et 12 du LBD servent de site de liaison pour les cofacteurs : il s'agit de la fonction AF-2. Les résidus de la fonction AF-2 participent à une surface qui possède une face hydrophobe et une face acide. Onze de ces résidus interagissent avec les cofacteurs, et quatre d'entre eux sont hautement conservés dans la famille des récepteurs nucléaires : Lys 362, Leu 379, Gln 375 et Glu 542 (Brzozowski et al., 1997)(Pike et al., 1999). La liaison d'agonistes active la fonction AF-2 et la liaison d'antagonistes l'inhibe. De récentes études suggèrent que les ligands régulent l'activité de la fonction AF-2 en modulant directement la structure du LBD.

Le ligand vient se poser au centre d'une cavité hydrophobe qui constitue le site de liaison de l'hormone. l'hélice H12 vient ensuite le bloquer dans cette position en se refermant par dessus comme "un couvercle". Cette position lui permet de cacher ses acides amines hydrophobes et de former avec des régions des hélices 3, 4 et 5 une surface d'interaction pour les cofacteurs.

La chaîne latérale des antagonistes, de par son encombrement stérique, va empêcher l'hélice H12 de se positionner par-dessus le site de liaison du ligand et ses acides aminés vont interagir avec des acides aminés du LBD normalement impliqués dans la liaison des cofacteurs. L'hélice H12 pourrait donc entrer en compétition avec les cofacteurs

pour ce site de liaison (Brzozowski et al., 1997)(Mak et al., 1999)(Pike et al., 1999)(Pike et al., 2000)(Pike, Brzozowski et al., 2000)(Pike et al., 2001).

Dans la plupart des cellules, la fonction AF-1 et la fonction AF-2 travaillent en synergie pour optimiser l'activité transcriptionnelle, même si dans certains types cellulaires, on peut observer une activation transcriptionnelle en absence de la fonction AF-2 (McInerney & Katzenellenbogen 1996).

Une des hypothèses stipule que l'interaction de ces deux fonctions s'effectue par l'intermédiaire d'une protéine "pont", comme un cofacteur par exemple. La coopération entre ces deux fonctions ne serait pas due à un changement de conformation induite par le ligand dans le LBD, se répercutant dans la région AF-1. Ces cofacteurs stabiliseraient l'interaction entre les fonctions d'activation AF-1 et AF-2. Webb et son équipe ont confirmé en partie cette hypothèse. En effet, il a prouvé que la fonction d'activation AF-1 peut lier les cofacteurs de la famille p160 (exemple: GRIP-1) et CBP/p300 à la fois dans le contexte d'un domaine isolé comme la région A/B et d'un ER entier lié à un antiestrogène de type Tam. Contrairement à la fonction AF-2 qui se lie à ces cofacteurs par leur motif "*NR box*", la fonction AF-1 se lie à ces cofacteurs par une séquence riche en Q en C-terminal des p160. Le niveau de p160 dans chaque lignée déterminerait la balance entre la synergie AF-1/AF-2 et l'activité indépendante de la fonction AF-1 (Webb et al., 1998).

### .3.4 Gènes cibles

Les gènes sous le contrôle des estrogènes possèdent dans leur promoteur un ou plusieurs ERE. Il s'agit majoritairement de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et dans la prolifération.

Les premiers gènes cibles des estrogènes à avoir été étudiés en détails sont ceux qui codent pour des protéines de sécrétion, souvent exprimés en grande quantité. Les mieux caractérisés sont sans doute ceux de l'ovalbumine de poulet et de la vitellogénine de *Xenopus* (Parker, 1995). Alors que ER se lie à un ERE assez simple pour la transcription du gène de l'ovalbumine, il implique d'autres facteurs de transcription, à savoir l'activator protein-1 (AP-1) en ce qui concerne le gène de la vitellogénine. Ainsi, les estrogènes sont capables de réguler des gènes qui ne possèdent pas d'ERE dans leur promoteur en régulant l'activité d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (Parker, 1995). Il semble qu'ils modulent l'activation de la transcription par l'un ou l'autre de ces mécanismes, ou encore par une combinaison des deux. Les estrogènes stimulent la prolifération de nombreuses cellules des tissus sexuels féminins, mais aussi de cellules cancéreuses de l'utérus, du sein, et des ovaires. Les estrogènes pourraient être indirectement mitogènes en augmentant la production de facteurs de croissance, ou en réduisant la production de facteurs inhibiteurs de croissance. Par exemple, les estrogènes augmentent la production de TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ) dans les tumeurs de sein et réprime la production du facteur d'inhibition de croissance TGF- $\beta$  dans les cellules ER positives de cancer du sein. Outre le fait de stimuler la production de

facteurs de croissance, ils augmentent également l'expression des récepteurs de ces facteurs de croissance comme par exemple celle du récepteur de IGF-I (insulin-like growth factor-I) ou du récepteur de EGF (epidermal growth factor). Ainsi, les effets majeurs des estrogènes sont indirects, et stimulent la croissance cellulaire par l'intermédiaire de mécanismes autocrines ou paracrines (Parker, 1995)(Parker et al., 1993).

De plus, les estrogènes régulent de nombreux gènes de la famille des gènes de réponse précoce immédiate impliqués dans la progression du cycle cellulaire, tels que ceux des familles Fos et Myc. Ils régulent à leur tour la transcription de gènes en aval impliqués dans la prolifération cellulaire, telles que les cyclines (ex : Cycline D1) et les kinases qui en dépendent (Parker, 1995).

### .3.5 Souris « knock-out »

La génération de souris knock-out pour ER $\alpha$  et  $\beta$  a permis d'élucider un peu mieux le rôle de ER dans les différents systèmes de signalisation hormonale impliqués dans le développement des glandes mammaires. Par exemple, les glandes mammaires de souris knock-out pour ER $\alpha$  ( $\alpha$ ERKO) n'effectuent pas leur développement alvéolaire, ni leur morphogénèse ductale. Les estrogènes et la progestérone sont requis pour le développement structural des glandes mammaires des souris  $\alpha$ ERKO. La manifestation du phénotype mammaire des souris  $\alpha$ ERKO est directement liée au manque d'effet

estrogénique au niveau des glandes mammaires (Bocchinfuso & Korach 1997)(Bocchinfuso et al., 2000).

Les souris knock-out pour ER $\beta$  quant à elles (BERKO) montrent plusieurs anomalies morphologiques cérébrales. On trouve une hypocellularité neuronale et un sévère déficit sensoriel au niveau du cortex. ER $\beta$  semble donc être nécessaire pour la survie neuronale. Ce gène pourrait avoir une importance capitale dans le développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson(Wang et al., 2001).

Chez chacune de ces souris,  $\alpha$ ERKO et BERKO, le comportement sexuel est peu ou pas affecté, même si les souris  $\alpha$ ERKO démontrent moins d'éjaculations et sont infertiles (Ogawa et al., 1996)(Ogawa et al., 1999).

Les souris ( $\alpha\beta$ ERKO) knock-out pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  en revanche perdent totalement toutes les composantes du comportement sexuel et leur agressivité. Ainsi, un seul des isotype de ER est suffisant pour observer certaines caractéristiques du comportement sexuel et il y a alors redondance de fonction. D'autres fonctions en revanche, telles que les attaques offensives, ne dépendent que de ER $\alpha$  (Ogawa et al., 1999)(Ogawa et al., 2000).

#### .4 Ligands du Récepteur des Estrogènes :

Les antiestrogènes peuvent être classifiés en deux groupes majeurs. Le type I qui comprend les antiestrogènes à effet agoniste partiel (appelés aussi des SERMs) et le type

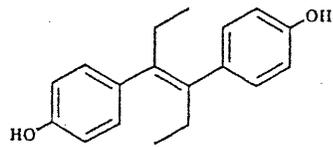
II qui comprend les antiestrogènes purs (totaux). Les agonistes sont des estrogènes naturels ou synthétiques (Fig 2)

**Figure 2 : Structure des ligands de ER**

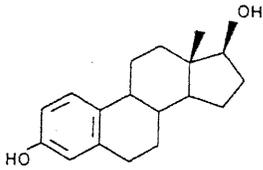
Le 17- $\beta$  estradiol est une petite molécule hydrophobe qui comporte un noyau stéroïdien dihydroxylé. Les antiestrogènes possèdent un noyau stéroïdien sur lequel vient se greffer une chaîne latérale de taille et de charge variable

Fig.2

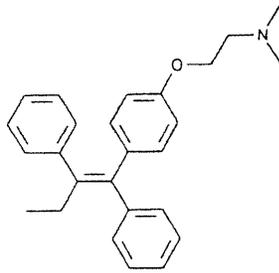
Structure des agonistes et antagonistes de ER



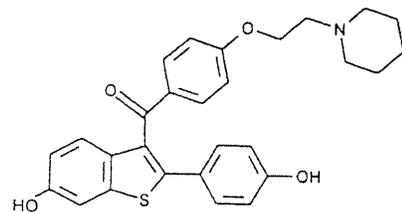
DES



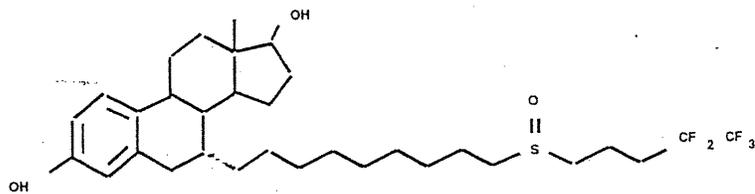
ESTROGÈNES



TAMOXIFÈNE



RALOXIFÈNE



ICI182,780

#### .4.1 Agonistes :

Le ligand naturel de ER est le 17- $\beta$  estradiol. Les estrogènes font partie de la classe des hormones stéroïdiennes, c'est à dire que leur structure chimique comprend le noyau stéroïdien composé de 4 cycles carbonés. La structure minimale reconnue pour son activité estrogénique a tout d'abord été l'anol, une structure phénolique non stéroïdienne, mais il a été mis en évidence plus tard que c'était son produit de dimérisation, le dianol qui possédait une activité estrogénique. Entre autre, le phénol rouge, indicateur de pH utilisé dans les milieux de culture peut s'isomériser en un composant biphénolique qui est contaminant estrogénique. Ce composé se rapproche beaucoup au niveau structural du diéthylbestrol (DES) qui se trouve être un puissant estrogène synthétique (MacGregor & Jordan 1998).

#### .4.2 Antagonistes partiels ou SERMs (type I) : Tam, Ral, RU<sub>p</sub>, LY117018

Les antiestrogènes de type I sont divisés en deux catégories selon leur structure. Ainsi il y a les antiestrogènes de type I stéroïdiens comme le RU 39 411 et les antiestrogènes de type I non-stéroïdiens comme le tamoxifène, le toremifène, l'idoxifène, le droloxifène, le raloxifène et le LY 117 018 .

Les antiestrogènes de type I sont aussi appelés des SERMs (*Selective Estrogen Receptors Modulators*). Ce sont des molécules qui se lient aux récepteurs des estrogènes et induisent une réponse cellulaire agoniste ou antagoniste en fonction du tissu sur lequel ils agissent. L'objectif est de créer des antiestrogènes ayant un effet agoniste au niveau des tissus osseux et du cholestérol et un effet antagoniste au niveau des tissus mammaires et endométriaux pour être utilisés comme traitement de ces cancers (Fontana & Delmas, 1999).

Plusieurs hypothèses tentent encore d'expliquer le mécanisme d'action des SERMs. Il se peut que ces molécules bloquent la fonction AF-2 du ER tout en activant la fonction AF-1 de celui-ci. Or, la contribution de la fonction AF-1 dans l'activité transcriptionnelle est promoteur/cellule/tissu spécifique (Fuhrmann et al., 1998).

Le Tamoxifène (*Nolvadex; AstraZeneca Pharmaceuticals, Wilmington, DE*), antiestrogène le plus couramment utilisé comme traitement adjuvant des cancers du sein ER+ chez les femmes ménopausées, est à l'origine du concept de SERM. Il est composé d'une structure triphényléthylène et son métabolite actif est le 4-hydroxytamoxifène. Son activité antagoniste lui permet de contrôler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. De plus, il y a une bénéfique inhibition de l'absorption de la masse osseuse (Stewart & Stern, 1986). On observe également une diminution du cholestérol total d'environ 13% (Saarto et al., 1996). En revanche, le plus sérieux effet indésirable de Tam est son activité estrogénique dans l'endomètre utérin qui résulte en une hyperplasie de l'endomètre et à une augmentation de l'incidence des cancers de l'endomètre (Gottardis et al., 1990)(Jordan et al., 1991).

Le toremifène (*Fareston, Schering corp, Kenilworth, NJ*) (le chlorotamoxifène) est un analogue de Tam. Ce composé moins puissant est un antiestrogène et un agent antitumoral utilisé comme traitement dans les cas de cancer du sein ER+ et aussi comme traitement adjuvant (Kangas, 1992)(Valavaara & Kangas, 1988).

Le idoxifène est un autre analogue du tamoxifène. Ce composé démontre des propriétés antiestrogéniques et antitumorales en laboratoire (Chander et al., 1991).

Le droloxifène ou le 3-hydrotamoxifène démontre une bonne activité antitumorale sur des modèles de laboratoire (Loser et al., 1985).

Le Raloxifène (*Evista, Eli Lilly and co., indianapolis, IN*) et ses analogues, LY 117 018 et LY357489, ainsi que le GW 5638 (GW) sont des antiestrogènes non stéroïdiens. Ce sont des dérivés de benzothiophène qui possèdent une affinité pour ER aussi grande que l'estradiol mais un plus faible effet estrogénique que Tam au niveau de l'endomètre utérin des rongeurs. Le Ral est actuellement utilisé dans le traitement de l'ostéoporose, et en cours d'étude clinique pour son effet préventif des cancers du sein (Grese et al., 1997)(Jordan, 1983).

D'autres SERMs sont actuellement étudiés (ex. RU 39 411).

Le point commun (de point de vue structure) entre les antiestrogènes de type I les mieux caractérisés (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 ne se trouve pas dans la chaîne latérale des antiestrogènes totaux. Il est possible que cette chaîne latérale qui n'existe pas dans le cas des estrogènes et le groupe amine

tertiaire qui n'existe pas chez les antiestrogènes totaux soient responsables de la réponse pharmacologique des antiestrogènes de type I.

#### *.4.3 Antagonistes totaux (type II) : ICI182,780, RUt*

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer l'effet de ces composés. Premièrement, il est possible que même lié aux antiestrogènes de type II, ER soit encore capable de lier son ERE mais que ses deux fonctions d'activation AF-1 et AF-2 soient bloquées. Deuxièmement, la longue chaîne latérale des antiestrogènes de ce groupe pourrait empêcher la dimérisation du récepteur diminuant ainsi les chances de ER de fixer son ERE. Troisièmement, les antiestrogènes totaux pourraient diminuer le niveau de ER circulant en provoquant une déstabilisation de ER qui favoriserait sa dégradation. Jusqu'à maintenant les trois hypothèses sont appuyées par des résultats expérimentaux (Dauvois et al., 1993)(Fuhrmann et al., 1998).

Le premier composé à être découvert a été le ICI164,384 (Wakeling, 1992).

ICI182,780 est plus efficace que ICI164,384, il est utilisé dans le traitement du cancer du sein après l'échec du traitement par le Tam. L'inconvénient de ces composés est qu'ils sont insolubles et ne peuvent pas être administrés oralement.

Le RU 58668 est substitué en  $11\beta$  par une longue chaîne latérale hydrophobe. Ce produit a le même arrangement spatial de la chaîne latérale que la chaîne latérale en  $7\alpha$  du ICI164,384 et du ICI182,780 (Van et al., 1996).

Tous les antiestrogènes totaux semblent être caractérisés par le cycle aromatique, la longue chaîne latérale d'au moins 5 carbones en  $11\beta$  ou en  $7\alpha$ . Contrairement aux antiestrogènes de type I, les antiestrogènes de type II ont des groupements sulfoxyde ou sulfonyle au lieu du groupement électrophile amine tertiaire.

Les antiestrogènes de ce groupe ne sont utilisés qu'en cas d'échec des traitements classiques avec les SERMs puisqu'ils ont un effet néfaste sur la masse osseuse.

## .5 Interaction du Récepteur avec les Facteurs de Transcription Généraux, et les Cofacteurs :

ER interagit avec de nombreuses composantes de la machinerie transcriptionnelle de base, mais aussi avec de nombreux facteurs intermédiaires de transcription, les TIFs, qui interagissent avec ER de manière ligand-dépendante. La composition cellulaire en TIFs variable d'un contexte à un autre modifie l'activité transcriptionnelle de ER.

### *.5.1 Machinerie Transcriptionnelle Générale*

La transcription de gènes par les activateurs transcriptionnels implique l'assemblage du complexe de préinitiation. De nombreux facteurs de transcription de base sont requis pour que la RNA polymérase II puisse initier la transcription (Beato et al., 1996). Parmi eux, TFIID va d'abord se lier à la boîte TATA, suivi de l'enchaînement de liaison

séquentiel TFIIB et TFIIF. TFIID est composé de TBP (TATA binding protein), et des facteurs associés à TBP ou TAFs. Ils forment un méga complexe appelé TFIID. TFIIB interagit ensuite avec TBP, l'ADN, TFIIF, et avec ER. La surexpression de TBP augmente la transactivation de ER. De plus, TBP et ER interagissent ensemble *in vitro* (Sadovsky et al., 1995). ER interagit avec les TAFII. Par exemple, la transactivation de ER requiert la présence de TAFII30 et ces deux protéines interagissent *in vitro* (Jacq et al., 1994).

ER interagit également indirectement avec cette machinerie, par l'intermédiaire de cofacteurs. Ces cofacteurs interagissent avec ER dans la région AF-2. RIP140, GRIP1, TIF1, SUG-1 SRC-1 sont capables de se lier à la région AF-2 de ER et à CBP/P300. CBP se lie spécifiquement à la forme phosphorylée de CREB dont la région C-terminale interagit avec TFIIB. Les coactivateurs ne semblent pas interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle de base à une exception près : SUG-1 interagit avec TBP et TAFII30 (Beato et al., 1996).

## .5.2 Coactivateurs

Le degré de compaction de la chromatine contrôle la transcription. En effet, pour permettre aux récepteurs nucléaires d'agir, il faut que le promoteur soit accessible. L'hyperacétylation des histones décondense la chromatine qui se trouve alors dans un état transcriptionnellement ouvert, son hypoacétylation la met dans un état fermé qui

réprime la transcription. Les coactivateurs identifiés possèdent une activité Histone acétyl transférase (HAT), qui leur permet de déverrouiller la chromatine, et d'augmenter la transcription. Ils sont en quantité limitante dans la cellule et régulent ainsi l'activité transcriptionnelle. Il s'agit d'une titration des coactivateurs ou « Squelching » des coactivateurs.

#### .5.2.1 Famille p160

Cette famille de coactivateurs inclut SRC-1/NcoA-1, TIF-2/GRIP-1/NcoA2, et AIB1/pCIP/ACTR. Ces coactivateurs ont été isolés en dans un système de double hybride utilisant le domaine C-terminal qui possède la fonction d'activation ligand-dépendante AF-2 (Li et al., 1997)(Onate et al., 1995)(Torchia et al., 1997)(Voegel et al., 1996). Ces protéines d'un poids moléculaire avoisinant les 160 kDa (d'où leur nom!) possèdent un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NR) composé de trois boîtes NR (NR box) qui contiennent chacune un motif LxxLL. Ce motif est responsable et suffisant pour permettre la fixation du coactivateur dans le sillon de recrutement des coactivateurs de ER formé par les résidus hydrophobes des hélices 3, 4, 5, et 12. Les coactivateurs de la famille p160 possèdent en outre un domaine d'interaction avec CBP/P300 en position carboxy terminale et aussi deux motifs LxxLL (McInerney et al., 1998)(Onate et al., 1995)(Torchia et al., 1997). Et enfin, à l'extrémité C-terminale, on trouve deux domaines d'activation transcriptionnelle indépendants AD-1 et AD-2.

Récemment, il a été mis en évidence que le domaine AF-1 de ER pouvait interagir avec une région riche en Q dans la partie C-terminale de TIF-2. Les coactivateurs de la famille p160 pourrait ainsi participer à la coopération entre les domaines AF-1 et AF-2 de ER.

### .5.2.2 CBP/P300

Le mécanisme de coactivation par les coactivateurs de la famille p160 a été un peu éclairci par les observations prouvant que SRC-1 pouvait interagir avec la partie C-terminal de CBP (Benecke et al., 2000). De plus CBP/P300 peut lui même interagir avec ER d'une manière ligand dépendante : ER et CBP/P300 agissent alors en synergie pour contrôler l'activité transcriptionnelle. CBP/P300 et ER possèdent une activité HAT intrinsèque (Korzus et al., 1998). L'action de CBP/P300 requiert à la fois sa fonction enzymatique et son rôle de plate-forme ou de pont pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base (Glass et al., 1997)(Kobayashi et al., 2000)(Korzus et al., 1998).

### .5.3 *Corépresseurs*

En absence de ligand, plusieurs récepteurs nucléaires (TR et RAR) s'associent avec un corépresseur des récepteurs nucléaires ou NcoR ou avec SMRT (silencing mediator of

retinoid and thyroid receptor). Leur fonction régulatoire est modulée par la nature physiologique et pharmacologique des divers ligands, et par plusieurs voies de transduction de signal. ER, quand à lui, en présence d'antagonistes tels que Tam et RU486 est capable de se lier à ces corépresseurs (Collingwood et al., 1999)(Laherty et al., 1998). NcoR et SMRT font alors partie d'un complexe qui contient SIN3, un intermédiaire entre ER et les histones-déacétylases, et des déacétylases elles-mêmes. La conséquence de cette concentration locale de protéines possédant une activité enzymatique HDAC est de stabiliser la structure de la chromatine et de réprimer la transcription (Lavinsky et al., 1998). On pense qu'en présence d'antagoniste il y a un changement conformationnel dans les récepteurs stéroïdiens. Ce changement dans la conformation causerait une liaison non-productive du récepteur à son élément de réponse. Il reste cependant à savoir si le récepteur va recruter les corépresseurs avant ou après la liaison à son élément de réponse.

## .6 Modulation de la réponse agoniste du récepteur des estrogènes :

### .6.1 *Facteurs de croissance : facteurs extérieurs*

Les facteurs de croissance tels que IGF-1 (insuline-like growth factor-1), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ) et EGF (epidermal growth factor) semblent activer certains récepteurs stéroïdiens (Tsai & O'Malley, 1994). L'équipe de El-Tanani a démontré que dans des cellules HeLa, EGF est capable d'activer ER en absence

d'estrogènes (activation ligand-indépendante) (Katzenellenbogen et al., 2000). Cependant cette activation est inférieure à celle observée en présence de E<sub>2</sub>. De plus, l'activation en présence de EGF et E<sub>2</sub> est additive ce qui suggère deux voies d'activation différentes pour ces deux composés. EGF agirait sur son récepteur membranaire qui induirait la phosphorylation de certains résidus dans la fonction AF-1 de ER. Il est à noter que cette activation peut être bloquée par la présence d'antagonistes totaux comme ICI164,384 (El Tanani & Green, 1997)(El Tanani & Green,1997).

## .6.2 Phosphorylation

La phosphorylation des facteurs de transcription est un processus permettant de moduler la réponse des récepteurs nucléaires à un ligand. Les récepteurs stéroïdiens sont des phosphoprotéines et leur activation peut être régulée par la phosphorylation. Elle affecte la translocation nucléaire, la liaison du ligand, la liaison à l'ADN, les interactions avec d'autres protéines et la transactivation.

Ali *et al.* ont démontré que ER peut être hautement phosphorylé suite à un traitement aux estrogènes. Les antiestrogènes (Tam et ICI164,384) peuvent aussi induire une phosphorylation de ER mais à un niveau moindre que celle observée en présence d'E<sub>2</sub> (Ali et al., 1993).

Il semble que la sérine 118 (Ser 118), dans le domaine A/B de ER, soit un site majeur de phosphorylation (Ali et al., 1993)(Kato et al., 1995). D'autres groupes rapportent,

comme sites de phosphorylation de ER, la Tyr 537, la Ser 167, la Ser 104 et la Ser 106 (Le Goff et al., 1994)(Ali et al., 1993)(Arnold et al., 1994). La sérine 118 semble être phosphorylée par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). La phosphorylation de cette sérine est importante pour observer une activité totale de la fonction AF-1(Kato et al., 1995). Le groupe de Ali *et al.* a démontré par mutagenèse dirigée que muter la sérine 118 en alanine réduit l'activité de ER d'environ 25%. Cette diminution est promoteur et cellule spécifique. Elle n'affecte pas la liaison de ER à son ERE, ni la localisation nucléaire de ER (Ali et al., 1993)(Le Goff et al., 1994).

Les protéines kinases A et C (PKC et PKA) et la caséine kinase pourraient être également impliquées dans la phosphorylation de certains résidus de ER (Ali et al., 1993)(Arnold et al., 1994)(Kato et al., 1995)(Le Goff et al., 1994).

D'autres études ont démontré qu'en plus d'affecter l'activation transcriptionnelle, la phosphorylation peut aussi affecter la liaison à l'ADN de ER ainsi que sa dimérisation (Arnold et al., 1994).

### .6.3 Voie AP-1

Les récepteurs stéroïdiens interagissent aussi avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (*activating protein-1*). Cette interaction est indépendante de l'élément de réponse (Lucibello et al., 1990). ER se lie aux dimères Fos/Jun et régule leur activité transcriptionnelle positivement ou négativement. Jun et Fos sont impliqués dans la prolifération cellulaire et dans la différenciation. La réponse aux estrogènes dépend de la

quantité de Jun/Fos dans la cellule et de site de liaison AP-1 dans le promoteur des gènes cibles. Les estrogènes augmenteraient la liaison à l'ADN, et l'activité transcriptionnelle, mais n'affecteraient pas l'expression de Jun/Fos. La voie AP-1 constitue donc une voie alternative d'action des estrogènes ou antiestrogènes tels que le tamoxifène (Kushner et al., 2000)(Webb et al., 1995).

#### *.6.4 Modification de la structure de la chromatine*

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 chromatine. Il est constitué par l'enroulement de 146 paires de bases d'ADN autour d'un octamère de protéines: les histones (Voet D et Voet JG, 1990). Les histones sont des protéines basiques, riches en lysine et arginine. Les charges positives de ces protéines permettent une interaction avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. Le nucléosome est 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 l'introduction d'un groupement acétyle sur un résidu lysine. Cette acétylation des histones neutralise la charge positive des histones ce qui empêche les protéines d'interagir avec l'ADN, ce dernier devient

donc accessible aux facteurs de transcription. L'acétylation des histones est réalisée par les histones acétyltransférases et la déacétylation est réalisée par des histones déacétylases (Pazin & Kadonaga, 1997)(Pazin et al., 1997).

#### *.6.5 Conformation du récepteur : Structure cristallographique et modélisation*

La structure des complexes formés entre le LBD de ER $\alpha$  et les agonistes E<sub>2</sub> ou DES, et les antagonistes partiels Ral ou Tam a été déterminée par une série de remplacements isomorphes combinés à des mesures cristallographiques. La conformation du récepteur en présence d'agonistes ou antagonistes est très semblable sauf dans la région AF-2 dont la conformation est modulée par la structure des différents ligands.

##### *.6.5.1 Structure générale*

La structure du ER $\alpha$ -LBD est similaire à la structure cristalline du LBD d'autres récepteurs nucléaires (Renaud & Moras, 2000). Le LBD est formé de trois couches d'hélices  $\alpha$  anti-parallèles, un ``sandwich`` d'hélices  $\alpha$  qui compriment un noyau hydrophobe en leur milieu (Brzozowski et al., 1997). Une hélice (H12) ainsi que deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles (S1 et S2) flanquent ce motif central (Fig.2).

**Fig.3 : Structure cristallographique du LBD de ER lié à E<sub>2</sub>.**

Le LBD de ER est formé d'un sandwich d'hélices  $\alpha$  qui délimitent une cavité hydrophobe dans laquelle vient se loger E<sub>2</sub>. L'hélice H12 l'y enferme en se repliant par dessus lui comme un couvercle.

Fig.3

A.

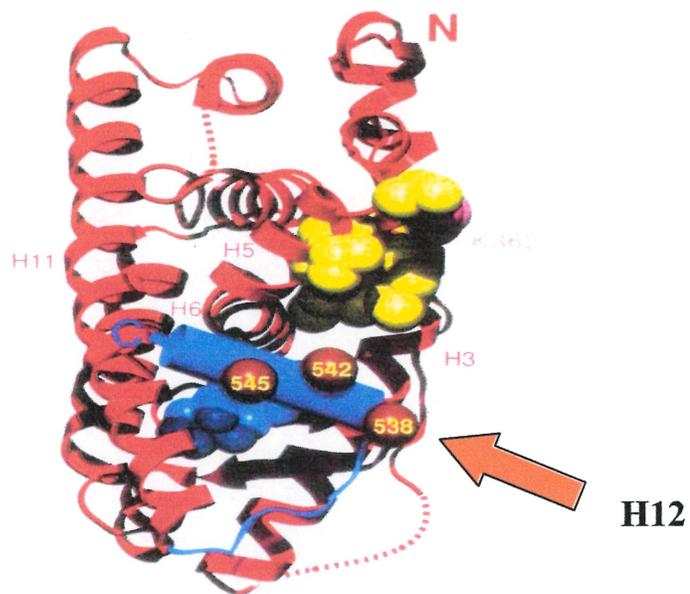
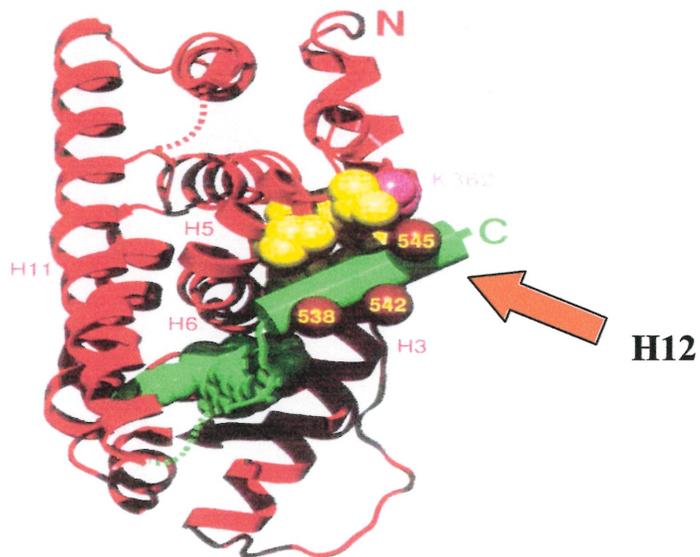


Fig.4

B.



(Brzowski *et al.*, 1997, Nature)

La nature du ligand ne modifie pas l'arrangement homodimérique du récepteur qui reste le même dans le cas du complexe ER-LBD-agoniste ou 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 s'établit entre les hélices H11 et dans une moindre mesure par H8, H9 et H10.

#### .6.5.2 E2

Le site de liaison pour E<sub>2</sub> occupe une grande partie du noyau hydrophobe de ER-LBD (Fig.3).

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) participe à la formation de cette cavité centrale hydrophobe. La reconnaissance de l'hormone se fait par une série de liaisons spécifiques non-polaires de type pont hydrogène, entre les acides aminés de la cavité hydrophobe et E<sub>2</sub>. La liaison de E<sub>2</sub> à la cavité du LBD entre les hélices H3, H6 et H11 permet au LBD d'adopter une conformation faible en énergie. Dans cette conformation, E<sub>2</sub> fait une liaison hydrogène

directe avec Glu 353 (H3), Arg 394 (H6) et His 524 (H11). E<sub>2</sub> forme également des liaisons hydrophobes avec le LBD comme les liaisons non-polaires avec Ile 424, Gly 521 et Leu 525. Cette combinaison entre des liaisons polaires et non-polaires permet à ER de reconnaître et de lier E<sub>2</sub> avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Brzozowski et al., 1997)(Pike et al., 1999).

H12 se positionne au-dessus de la cavité hydrophobe entre H3, H5/6 et H11 dans le cadre de E<sub>2</sub>-LBD (Fig.2). Même si elle ne fait pas de contact direct avec E<sub>2</sub>, l'hélice 12 forme un "couvercle" qui se referme au dessus de cette cavité en orientant sa surface hydrophobe vers E<sub>2</sub>. Cette orientation de l'hélice 12 semble être nécessaire à l'activation transcriptionnelle. Dans cette configuration, elle confère une surface d'interaction pour les cofacteurs. Le site de liaison des cofacteurs est composé des acides aminés de H3 (Leu 354, Leu 355, Ile 358, Ala 361 et Lys362), H4 (Phe 367 et Val 368), H5 (Gln 375, Val 376, Leu 379 et Glu 380) et H12 (Asp 538, Leu 539, Glu 542 et Met 543) (Shiau et al., 1998).

### .6.5.3 Tam/Ral

Ral se lie au LBD dans la même cavité que E<sub>2</sub> (Fig.4).

**Fig.4 : Structure cristallographique de ER-LBD lié à Ral.**

Le Ral occupe la même place que E<sub>2</sub> au sein de la cavité hydrophobe délimitée par les hélices  $\alpha$ . Sa chaîne latérale repousse l'hélice H12 qui vient alors occuper la surface de recrutement des coactivateurs.

Le groupement hydroxyle de son benzothiophène mime le groupement hydroxyle du cycle aromatique A et permet la liaison au Glu 353 (H3). Par contre, la liaison hydrogène avec His 524 (H11) est déplacée de 5.1 Å par rapport à sa position en présence de E<sub>2</sub>. Pour maintenir une position favorable à la liaison d'hydrogène, il y a rotation du groupement imidazole.

Les interactions non-polaires sont les mêmes que dans le cas de E<sub>2</sub>-LBD. La chaîne latérale du Ral participe à des liaisons hydrophobes avec les hélices H3, H5/6, H11 ainsi qu'avec une partie de la boucle située entre les hélices H11 et H12. Cette chaîne latérale est fixée au LBD par une liaison hydrogène directe entre l'amine tertiaire du Ral et l'Asp 351 (H3).

Le mauvais positionnement de l'hélice 12 est dû à la chaîne latérale basique des antiestrogènes qui dépasse de la cavité hydrophobe, fixée dans cette position par la liaison avec l'Asp 351, et qui empêche son repliement par-dessus le site de liaison de l'hormone (Brzozowski et al., 1997)(Pike et al., 1999).

Bien que tous les antiestrogènes qui possèdent une chaîne latérale encombrante déplacent l'hélice H12, ils ne la déplacent pas tous dans la même position. Ainsi, en présence de Ral, pourtant de structure très proche de celle de Tam, l'hélice H12 dans la configuration ``antiestrogènes`` est déviée de quelques degrés sur le plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice et rend accessible la lys 362 qui ferme le sillon de recrutement des coactivateurs. Le coude entre l'hélice H11 et l'hélice H12 est de ce fait légèrement déplacé et les résidus de ce coude exposés sous un angle un peu différent (Fig.5, 6, 7).

**Fig.5 : Structure du LBD de ER lié à E<sub>2</sub>.**

L'hélice H12 en vert se replie au dessus du ligand et laisse la surface de recrutement des coactivateurs libre. Le coude entre l'hélice H11 et l'hélice H12 est en couleur cyan.

Les résidus lysine 529 et 531 (en rouge) sont tournés vers l'extérieur de la molécule.

Fig.5

# STRUCTURE DU ER-LBD EN PRÉSENCE D'ESTROGÈNE

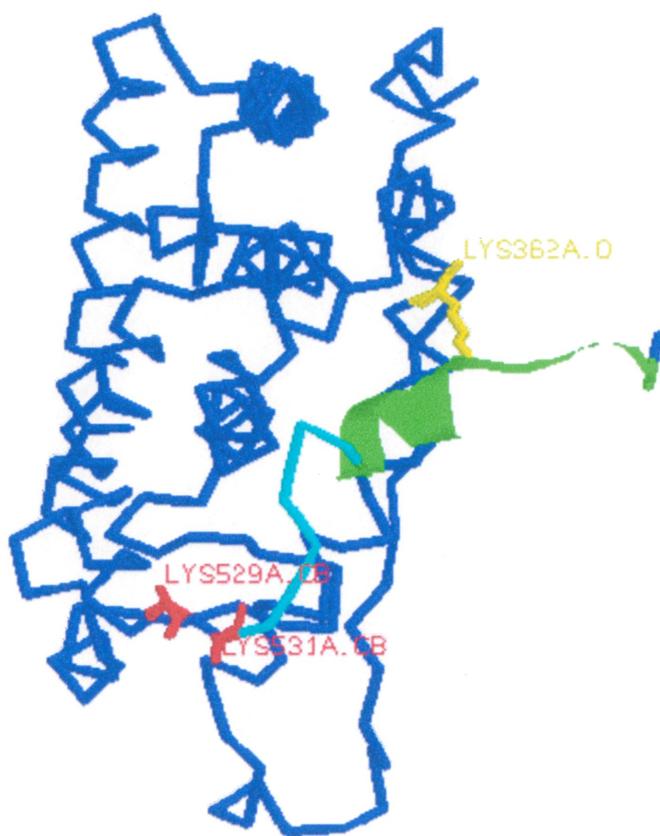


**Fig.6 : Structure du LBD de ER lié à Tam.**

L'hélice H12 (en vert) est déplacée de sa position d'origine et masque la lysine 362 (en jaune). Les résidus du coude entre l'hélice H11 et l'hélice H12 (de couleur cyan) adoptent une orientation dans l'espace différente de celle observée en présence de E<sub>2</sub>.

Fig.6

# STRUCTURE DU ER-LBD EN PRÉSENCE DE TAMOXIFÈNE



**Fig.7 : Structure du LBD de ER lié à Ral.**

L'hélice H12 (en vert) est déplacée de sa position d'origine et par rapport à sa position en présence de Tam. Elle démasque la lysine 362 (en jaune) alors potentiellement accessible à d'autres protéines. Les résidus du coude entre l'hélice H11 et l'hélice H12 (de couleur cyan) adoptent une orientation dans l'espace différente de celle observée en présence de E<sub>2</sub>.

Fig.7

# STRUCTURE DU ER-LBD EN PRÉSENCE DE RALOXIFÈNE



Cette liaison entre la chaîne latérale des antagonistes partiels et l'acide aminé Asp 351 perturbe l'emplacement de l'hélice 12 qui est alors amenée directement dans le site de liaison des coactivateurs. Ce déplacement de l'hélice 12 est retrouvé chez tous les antiestrogènes ayant une chaîne latérale encombrante. Cette réorientation de l'hélice 12 cache certains acides aminés de l'hélice qui sont importants lors du recrutement des cofacteurs et elle fait des interactions avec des acides aminés du LBD qui normalement sont impliqués dans la liaison des cofacteurs. Il se peut donc que le Ral et d'autres antagonistes à chaîne latérale encombrante affectent la fonction AF-2 par un réarrangement de la surface du AF-2.

#### *.6.6 Niveau de ER dans la cellule*

Un des facteurs importants dans la modulation de l'activité transcriptionnelle de ER réside dans le contrôle de la quantité de protéines présentes dans la cellule. Pour réguler cette concentration, la cellule dispose de plusieurs moyens : le contrôle du transit nucléocytoplasmique, le contrôle de l'expression, de la protéolyse et du recyclage du récepteur, et l'agrégation en amas de protéines non fonctionnelles.

En présence de différents ligands, l'un ou l'autre, ou une combinaison de ces procédés cellulaires seront utilisés par la cellule pour optimiser l'activité transcriptionnelle de ER dans le cas d'agonistes, ou pour l'inhiber dans le cas d'antagonistes partiels ou totaux.

En présence de ICI 164384 ou de RU 58668, l'équipe de Catelli a mis en évidence par immunocytofluorométrie que le transport nucléocytoplasmique de ER était interrompu (Devin-Leclerc et al., 1998). ER s'accumule alors dans la région périnucléaire du cytoplasme sous forme de corps d'inclusion. Bien qu'aucun de ces agrégats n'ait été purifié ou caractérisé de plus près, les mécanismes d'agrégation et de délocalisation de ER semblent conjointement impliqués dans la diminution drastique de ER observée en présence d'antiestrogènes totaux. De plus, le groupe de Leclercq a démontré que la dégradation protéasomale était aussi impliquée dans ce phénomène (El Khissiin & Leclercq, 1999). Ce conflit apparent de la littérature pourrait être résolu si on imagine que les mécanismes de dégradation et d'agrégation puissent coexister. La dégradation serait alors subséquente à l'agrégation des récepteurs et ce seraient les agrégats qui seraient dégradés. Comme le protéasome est ubiquiste au sein de la cellule, la dégradation de récepteurs libres au sein du noyau est également envisageable.

En présence d'estrogènes, ER est dégradé via la voie protéasomale, mais également, son expression est soumise à un rétrocontrôle négatif observé par buvardage de type Northern (Parker, 1993).

## .7 Effets du Phénomène d'Agrégation au Sein des Cellules :

Le système de dégradation via la voie ubiquitine-protéasome dégrade au sein des cellules les protéines mal repliées, endommagées ou mal assemblées. Il s'agit d'un

contrôle de qualité qui permet à la cellule d'évacuer des protéines qui pourraient éventuellement former des agrégats toxiques pour la cellule (Ciechanover et al., 2000)(Ciechanover et al., 2000). La présence d'un nombre élevé de produits ubiquitinés associés à des dépôts intracellulaires de protéines agrégées dans les maladies neurodégénératives avait depuis longtemps suggéré l'existence d'un lien entre les phénomènes d'agrégation et un dysfonctionnement du système de dégradation protéasomale (Mayer et al., 1989).

De nombreuses protéines mal formées sont exportées vers le cytoplasme où elles seront ensuite dégradées par le protéasome. Lorsque le protéasome n'est plus capable de compenser la synthèse de ces protéines, elles forment des agrégats qui seront séquestrés en suivant les microtubules dans des corps d'inclusion dans la région cytoplasmique péricentriolaire. Ces corps d'inclusion s'appellent des agrésomes (Johnston et al., 1998). Les cellules qui ont un défaut du système de conjugaison de l'ubiquitine ou qui sont exposées à des inhibiteurs du protéasome s'arrêtent en phase G2 du cycle cellulaire. De même, le groupe de Bence (2001) a observé que la présence d'agrégats dans les cellules corrélait avec l'existence d'une population de cellules arrêtées en phase G2. De plus, il est couramment accepté que l'agrégation de protéines est l'évènement central qui initie la mort cellulaire dans les maladies neurodégénératives. La répression de la croissance cellulaire de cellules ER positives observée en présence d'antagonistes totaux corrèle donc avec une éventuelle agrégation de ER.

L'agrégation des protéines mène également à l'accumulation intracellulaire de protéines conjuguées à l'ubiquitine. Il a été récemment suggéré que l'agrégation mènerait à

l'inhibition du système de dégradation via la voie du protéasome (Bence et al., 2001). Aucune expérience n'a pu encore montrer que la quantité d'ubiquitine libre dans la cellule était affectée par la présence de corps d'inclusion contenant des protéines ubiquitinées, ce qui aurait suggéré que les agrégats de protéines feraient baisser le pool de molécules d'ubiquitine libres de la cellule. Les agrégats pourraient également saturer la voie de dégradation protéasomale en interagissant directement avec le protéasome ou une de ses composantes. Interagissant avec une protéine ubiquitinée, celle-ci s'agrègerait et séquestrerait le protéasome au sein d'un corps d'inclusion, dans une configuration où il serait alors incapable d'effectuer son activité de protéolyse.

Récemment, l'équipe de Bence a montré que le phénomène d'agrégation empêche le système de dégradation protéasomale de fonctionner lorsque la protéine étudiée est surexprimée. En revanche à des niveaux d'expression physiologique, les cellules sont capables de supprimer cette agrégation en balançant la synthèse de la protéine par sa dégradation contrôlée par le protéasome (Bence et al., 2001).

#### .8 Dégradation du récepteur des estrogènes Via la Voie du Protéasome

Les protéines mal repliées, mal agencées, endommagées ou tronquées vont être soumises à une protéolyse via la voie du protéasome qui évitera à la cellule l'accumulation de produits toxiques. Les protéines reconnues pour être dirigées vers la voie protéasomale

vont subséquemment être ubiquitinées, puis dirigées vers le protéasome, et soumises à une protéolyse dans la sous unité catalytique de celui-ci. Cette réaction est ATP dépendante. Tout d'abord, les protéines doivent être reconnues par les enzymes d'ubiquitination.

### .8.1 Signaux d'ubiquitination

La sélectivité de la dégradation de protéines dépendant de l'ubiquitination est conférée par des interactions spécifiques entre des signaux en *cis* de la protéine à dégrader et des acteurs en *trans* de la machinerie d'ubiquitination. Des études biochimiques et génétiques ont démontré que la séquence en acide aminé qui identifie un substrat pour une multiubiquitination est souvent bipartite. La première partie est un site de reconnaissance pour les éléments de la machinerie d'ubiquitination, la deuxième est le site d'attachement du motif ubiquitine lui-même. Le site de reconnaissance peut être constitué de résidus basiques ou hydrophobes N-terminaux, d'une courte séquence consensus interne **R-A/T-A-L-G-X-I/V-G/T-N** comme dans le cas des cyclines (Germain et al., 2000), ou de phosphorylation(s) en amont du site d'ubiquitination comme par exemple pour I $\kappa$ B (Rodriguez et al., 1996) ou pour les  $\beta$ -Caténines.

Pour l'autre élément du site de reconnaissance, à savoir le site d'attachement de l'ubiquitine, aucune séquence consensus n'a été déterminée. Il semble que tant que la

chaîne latérale de la lysine est dans une position permissive stériquement, elle peut servir de site de liaison à l'ubiquitine.

Le site de reconnaissance et le site d'attachement peuvent se situer sur des chaînes polypeptidiques différentes dans des complexes multimériques. Ainsi une protéine portant un site d'attachement pour l'ubiquitine peut être ciblée pour la dégradation via le protéasome par une protéine différente en *trans* qui contient le motif de reconnaissance.

## .8.2 Ubiquitination

Le mécanisme de dégradation impliquant l'ubiquitine est très bien connu de nos jours. Il implique l'attachement covalent d'une ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés très conservé au cours de l'évolution, au groupement amine  $\epsilon$  de la chaîne latérale d'une ou plusieurs lysines de la protéine ciblée. Seules les molécules polyubiquitinées seront dégradées par le protéasome et on ne sait pas encore à quoi servent les monoubiquitinations. Dans quelques cas, il semble qu'elles soient suffisantes pour l'internalisation de récepteurs (Kornitzer & Ciechanover, 2000).

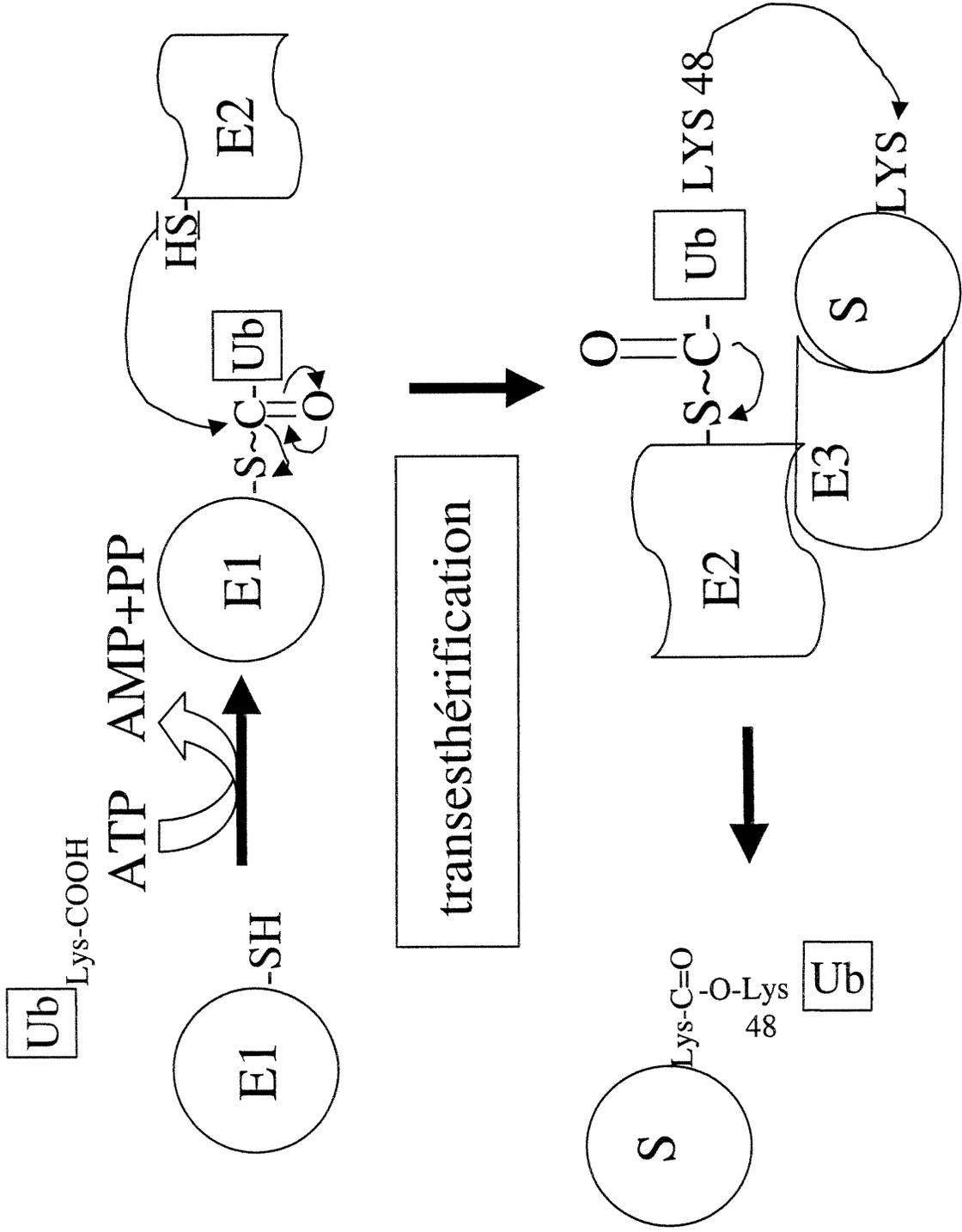
Les enzymes du système d'ubiquitination peuvent être subdivisées en trois classes, appelées E1, E2 et E3 (Hershko, 1988). E1 est l'enzyme d'activation de l'ubiquitine. Elle convertit une ubiquitine libre en une ubiquitine liée à E1 par une liaison thioester riche en énergie. Cette ubiquitine sera ensuite transférée à E2, qui est une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine. Les E2 sont capables de reconnaître les substrats et d'y

attacher de manière covalente l'ubiquitine. Pour la plupart des substrats, cette liaison requiert un auxiliaire, ou une activité intermédiaire fournie par E3, ou ubiquitine ligase (Fig.8).

**Fig.8 : Ubiquitination d'un substrat.**

E1 active l'ubiquitine qui sera ensuite transférée à E2, l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine au substrat. E3, ou ubiquitine ligase permet le rapprochement physique de E2 et du substrat et confère sa spécificité au système.

Fig.8



C'est cette enzyme E3 qui confère au système sa spécificité. La ligase est un complexe protéique ou une protéine capable de lier à la fois le substrat et E2. L'interaction avec le substrat peut être directe ou se faire par l'intermédiaire d'une protéine ancillaire. Le rôle principal de E3 est d'amener et de maintenir à proximité E2 liée à l'ubiquitine et le substrat. Dans quelques cas, l'ubiquitine activée est d'abord transférée à une cystéine de E3 avant d'être à nouveau conjuguée à la lysine cible du substrat. La plupart du temps, E3 ne possède pas ce rôle catalytique (Kornitzer & Ciechanover, 2000).

Ce cycle est répété une multitude de fois, la lysine du substrat ubiquitinée par la suite étant la lysine 48 de l'ubiquitine précédemment conjuguée.

La dégradation médiée par l'ubiquitine des protéines cytosoliques et membranaires s'effectue dans le cytoplasme et sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Même si les composantes du système de dégradation se retrouvent dans le noyau, la conjugaison d'ubiquitine et la dégradation n'ont pu y être démontrées (Ciechanover et al., 2000)(Ciechanover et al., 2000).

### .8.3 *Classes d'Ubiquitine-ligases*

Les ubiquitine-ligases E3 peuvent être divisées en au moins six classes, en fonction du signal qu'elles reconnaissent ou de leur structure.

### .8.3.1 E3 $\alpha$

Les E3 $\alpha$  , par exemple Ubr1 dans la levure, reconnaissent les résidus N-terminaux déstabilisants. E3 $\alpha$  reconnaît deux types de sites de liaison, des résidus N-terminaux basiques ou hydrophobes.

### .8.3.2 Protéines qui contiennent un domaine HECT

Ce domaine est homologue à l'extrémité carboxy terminale de l'ubiquitine-protéine ligase E6-AP. Il contient 350 résidus, dont une cystéine très conservée à laquelle l'ubiquitine activée va être transférée. E6-AP cible p53 pour une dégradation rapide en présence de l'oncoprotéine du virus papilloma (HPV) E6 (Scheffner et al., 1995) et les canaux sodiques de l'épithélium de la rate.

### .8.3.3 Le 'anaphase promoting complexe' (APC) ou cyclosome

Il est constitué de huit sous-unités et cible les substrats impliqués dans le cycle cellulaire, les mieux caractérisés étant les cyclines A et B. Au moins deux protéines ancillaires ont été identifiées. Leur stœchiométrie régule l'activité du APC. Les

cyclosomes reconnaissent une séquence consensus interne **R-A/T-A-L-G-X-I/V-G/T-N** appelée 'destruction box'.

#### .8.3.4 Les complexes SCF

Dans ce complexe, on trouve Skp1, Cdc53 chez la levure, les protéines F-Box, et chez les mammifères la protéine Cullin. La protéine F-box est la composante variable de ce complexe et lui assure sa spécificité de reconnaissance du substrat. Par exemple, SCF<sup>βTrCP</sup> reconnaît spécifiquement IκB les β-caténines et Vpu du virus VIH-1. Le signal reconnu par SCF<sup>βTrCP</sup> dans ces trois substrats est une modification post-transcriptionnelle : une phosphorylation.

#### .8.3.5 Les protéines Ring Finger

Plusieurs protéines ring finger semblent servir d'ubiquitine-ligases. Elles ciblent majoritairement des récepteurs tels que le récepteur à EGF ou à PDGF. Le domaine « ring finger » joue un rôle important dans la fonction ligase et possiblement dans la formation de la chaîne polyubiquitinée.

### .8.3.6 La protéine suppresseur de tumeur Von-Lindau (pVHL)

Elle appartient à un complexe qui ressemble beaucoup au complexe SCF, mais qui contient les protéines Elongin B et Cullin-2. Cette protéine pourrait catalyser la polyubiquitination.

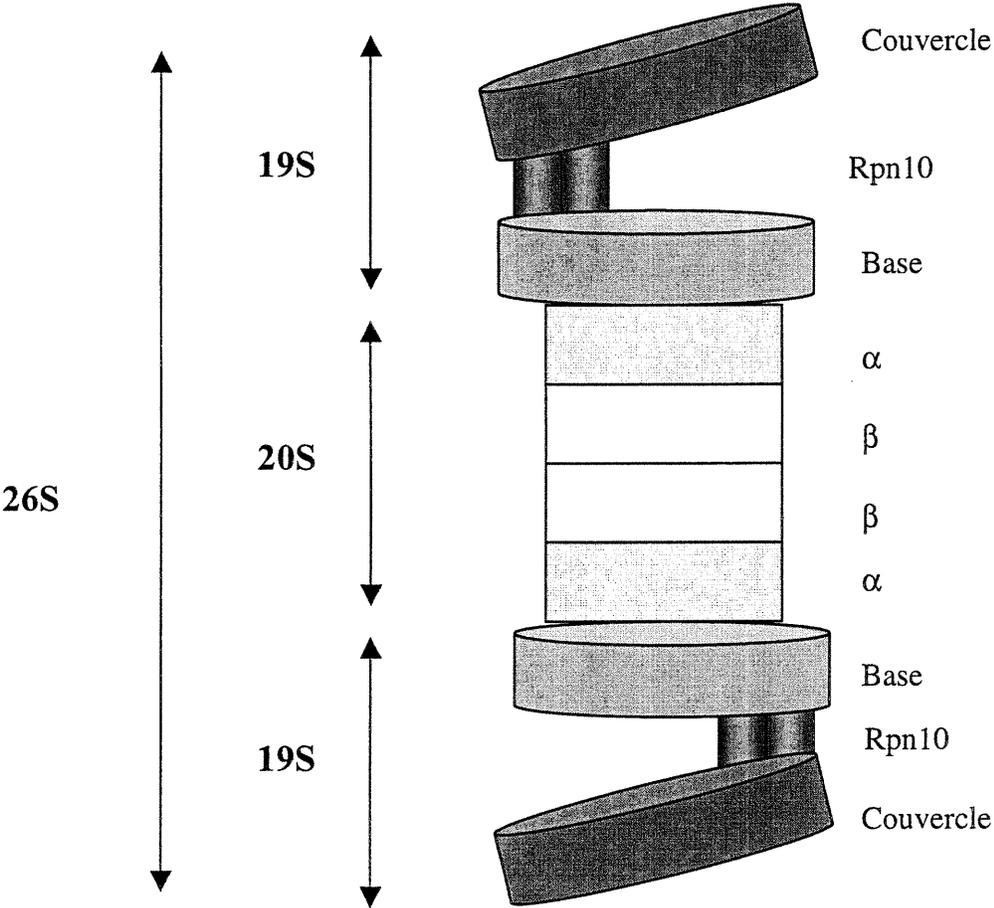
## .8.4 *Le Protéasome*

Le protéasome est une grosse protéase multicatalytique 26S qui dégrade les protéines polyubiquitinées en petits peptides (Voges et al., 1999). Il est composé de deux sous-complexes, un core catalytique 20S et un domaine de régulation 19S (Fig.9).

**Fig.9 : Structure du protéasome.**

Le protéasome est une grosse protéase multicatalytique de 26S composée de deux sous-complexes, un core catalytique de 20S et un domaine de régulation de 19S. Le core catalytique est formé de quatre anneaux empilés  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous unité de 20S est couverte à ses extrémités par un complexe protéique de 19S composé d'une dizaine de peptides différents. Lui même est composé de la base et d'un couvercle soudés ensemble par une unité de liaison à l'ubiquitine Rpn10.

Fig.9



Le protéasome est formé d'un cylindre central composé de plusieurs protéases dont les sites actifs forment une cavité interne : c'est le centre catalytique. Il est formé de quatre anneaux empilés, deux anneaux  $\alpha$  extérieurs identiques et deux anneaux  $\beta$  extérieurs également identiques. Les anneaux  $\alpha$  et  $\beta$  sont composés chacun de 7 sous unités distinctes. Par microscopie électronique, il a été mis en évidence que chaque extrémité du cylindre est couverte par un complexe protéique 19S composé d'une dizaine de peptides différents. La sous unité 19S de la levure a été purifiée et caractérisée. Son étude révèle qu'elle est composée de deux sous-unités, la 'base' formée de plusieurs ATPases, et un couvercle lui même composé de 8 sous-unités.

Une des fonctions de la sous-unité 19S est de reconnaître les protéines ubiquitinées et les autres substrats du protéasome. Une sous-unité de liaison à l'ubiquitine, Rpn10/Mcb1, y a été identifiée, mais il doit certainement en exister d'autres (Ciechanover et al., 2000)(von der Janich et al., 1985).

Une deuxième fonction imputable à cette sous-unité 19S et probablement conférée par les sous-unités ATPasiques est de servir de barrière à l'anneau  $\alpha$ . Les substrats ubiquitinés sont insérés dans cette chambre protéolytique et la sous-unité 19S les empêche d'en ressortir. Finalement, le dernier rôle prêté à cette sous-unité 19S serait de déplier les protéines afin qu'elles puissent pénétrer facilement dans la chambre protéolytique que constitue la sous unité 20S.

### .8.5 Régulation spécifique

La dégradation de substrats spécifiques est majoritairement régulée au niveau de l'ubiquitination. La régulation peut être médiée par des modifications post-transcriptionnelles ou par des changements structuraux qui rendent le substrat susceptible d'être reconnu par la ligase E3, ou encore par la modulation de l'activité des complexes E2/E3. Le mode de régulation dépend pour beaucoup de la classe de E3. Par exemple, l'ubiquitination par le complexe SCF requiert la phosphorylation du substrat. Dans ce cas, l'activité de la ligase est constitutive et l'étape régulatoire se situe au niveau de la phosphorylation (cas de I $\kappa$ B) ou de la déphosphorylation ( $\beta$ -caténines). La modulation de l'activité de SCF passe aussi par la disponibilité de la protéine F-box. La modulation de l'expression de la protéine F-box est donc un niveau de régulation supplémentaire.

La régulation de certaines classes de substrats peut également se faire par l'intermédiaire de la modulation de l'activité de la machinerie d'ubiquitination. L'activité du complexe APC est elle-même modulée par différents activateurs et inhibiteurs, ainsi que par des phosphorylations.

Les protéines ancillaires qui servent de pont entre le substrat et E3 sont également très importantes car elles confèrent une reconnaissance en trans. Par exemple, la dégradation de beaucoup de protéines est médiée par la formation d'un complexe avec les chaperonnes. Une protéine mal repliée et que la protéine chaperonne n'arrive pas à

remettre en forme en dépit de plusieurs cycles d'association et de dissociation, va être présentée par la chaperonne à la ligase pour sa dégradation subséquente.

Enfin, le masquage ou démasquage du signal de dégradation ou du site d'attachement de l'ubiquitine peut être un moyen efficace de réguler l'activité d'ubiquitination. Un changement de conformation peut donc être à l'origine de la modulation de la stabilité d'une protéine, comme dans le cas de l'expression du type MAT $\alpha$  ou MAT $\beta$  chez les levures.

## .9 Modulation de la Stabilité de ER

Le niveau de récepteur des estrogènes dans la cellule est un facteur majeur de régulation de la sensibilité des cellules aux estrogènes ou antiestrogènes. La concentration intracellulaire de ER dépend à la fois du taux de synthèse et du taux de dégradation du récepteur.

### .9.1 *Turn-over*

Plusieurs études ont utilisé des inhibiteurs d'ARN ou de synthèse protéique pour étudier le turn-over de ER, mais ces traitements affectent les autres fonctions cellulaires et rendent difficile l'interprétation des résultats. L'équipe de Eckert a suivi le turn-over ER en mesurant la vitesse d'incorporation d'acides aminés denses sur gradient de sucrose.

Ils ont ainsi pu estimer la demi vie de ER en absence de ligand à 4h.(Eckert et al., 1984). La dégradation via la voie du protéasome est un bon moyen de réguler le turn-over d'une protéine. Plusieurs études suggèrent la participation du protéasome dans la dégradation ligand indépendante de ER. En effet, un traitement avec plusieurs inhibiteurs spécifiques du protéasome tels que l'inhibiteur I, la lactacystine , MG132, MG115 ou le N-acetylleucylleucylnorleucinal (ALLnL) mène à l'accumulation de ER dans la cellule. Ces études ont été réalisées dans des cellules utérines transfectées HeLa, dans des cellules de carcinome mammaires MCF-7 et dans des cellules de l'hypophyse. Elles aboutissent toutes au même résultat, suggérant que la protéolyse via la voie ubiquitine-protéasome de ER en absence de ligand est un phénomène général utilisé par la cellule pour le recyclage de ER, et pas seulement un artefact de transfection (Alarid et al., 1999)(El Khissiin & Leclercq, 1999)(Nawaz et al., 1999).

### *.9.2 En présence d'estrogènes*

L'étude de Eckert (1984) montre que l'exposition des cellules à 10 nM d'estradiol augmente le taux de turn-over de ER. La demi-vie du récepteur passe alors de 4,0h en absence de ligand à 3,0h pour les récepteurs liés à l'estradiol (Eckert et al., 1984)(Seo et al., 1998). De plus, des extraits cellulaires de cellules MCF-7 traitées par de l'estradiol et analysées par immunobuvardage de type Western Blot montrent une réduction importante (environ 60% ) de la quantité de ER (Alarid et al., 1999)(El Khissiin &

Leclercq, 1999)(Nawaz et al., 1999). Ainsi, la stabilité de ER semble être affectée par la liaison à E2, son ligand naturel. La liaison de ER à un agoniste déstabilise le récepteur qui est dégradé plus rapidement. Des inhibiteurs des trois principales protéases de la cellule ont alors été testés, mais seul les inhibiteurs de protéasome sont capables de bloquer spécifiquement cette dégradation. Les inhibiteurs des calpains et des protéases lysosomales se révèlent inefficaces (El Khissiin & Leclercq, 1999)(Nawaz et al., 1999). De plus, la dégradation de ER par le protéasome a pu être mise en évidence *in vitro* (Nawaz et al., 1999). La présence d'enzymes d'ubiquitination UBA et UBC est nécessaire dans le mélange réactionnel pour observer la diminution de la quantité de ER, et l'apparition de bandes de poids moléculaire supérieur sur le gel pouvant correspondre à des molécules de ER ubiquitinées. Finalement, une coimmunoprécipitation avec un anticorps anti-ER et un anticorps anti-ubiquitine a révélé l'existence dans les cellules de ER-ubiquitiné après traitement aux estrogènes (Nirmala & Thampan, 1995).

ER n'est pas le seul récepteur stéroïdien dont la stabilité soit affectée par la liaison de ligands agonistes. La voie de dégradation protéasomale a pu être mise en évidence dans la dégradation induite par le ligand agoniste de VDR, AR, PR, TR, RAR et du récepteur aux Aryl hydrocarbones (AhR) (Dace et al., 2000)(Lange et al., 2000)(Masuyama & MacDonald, 1998)(Safe, 2000)(Kopf et al., 2000).

Tous les essais immunocytochimiques et immunobiochimiques révèlent un effet antagoniste de la Cycloheximide (CHX), un puissant inhibiteur de la synthèse protéique, sur l'élimination de ER induite par les agonistes (Borras et al., 1994)(Seo et al., 1998). Il se pourrait donc qu'une tierce protéine soit impliquée dans la dégradation via la voie

protéasomale de ER, ou que cette apparente inhibition soit due à une stabilisation de l'ARNm comme cela a été montré dans les cellules MCF-7 (Lee et al., 1996).

### *.9.3 En présence d'antiestrogènes partiels*

Contrairement aux estrogènes, Tam et RU39,411 stabilisent le complexe ER-AEs partiels. Le marquage *in situ* des cellules avec du tamoxifène aziride tritié [<sup>3</sup>H]TAZ qui se lie de manière covalente à ER, révèle qu'en présence d'antiestrogènes partiels la demi-vie de ER augmente pour atteindre 6h (Borras et al., 1994)(Seo et al., 1998). La balance entre synthèse et élimination de ER aboutit globalement à une augmentation du pool de ER dans la cellule. La synthèse continue de protéines est nécessaire pour observer cette augmentation du niveau de ER dans la cellule puisque l'addition de CHX l'inhibe (Seo et al., 1998).

Par immunocytochimie, on peut observer une augmentation de la coloration nucléaire, témoin d'une augmentation de la quantité de récepteurs localisés dans le noyau (Legros et al., 1997).

### *.9.4 En présence d'antiestrogènes totaux*

Contrairement aux antiestrogènes partiels, les antiestrogènes totaux tels que RU58,668 , ICI164,384 et ICI182,780 augmentent le turn-over de ER $\alpha$  de façon drastique. En 1991,

l'équipe de Gibson montre par des expériences d'échange de ligand que l'injection de 1 mg/kg de ICI164,384 à des souris ovariectomisées résulte en une réduction du nombre total de ER dans les utérus des souris (Gibson et al., 1991). Le récepteur aussi bien nucléaire que cytoplasmique dans ces cellules utérines atteint 25% de son niveau en absence de traitement. Cette réduction de la quantité globale du récepteur a été confirmée par des analyses de type Western à partir d'extraits cellulaires nucléaires et cytosoliques de cellules utérines prélevées. Des expériences de retard sur gel réalisées par l'équipe de Dauvois en 1992 ont mis en évidence une diminution de la quantité de récepteur des estrogènes de la souris MOR (Mouse Estrogen Receptor) transfecté dans des cellules COS-1 en présence de ICI164,384 (Dauvois et al., 1992). Des analyses par marquage radioactif et chasse de dans un milieu froid (pulse-chase) montrent que la demi-vie du récepteur des estrogènes en présence de ce ligand n'est que de 30 minutes (Dauvois et al., 1992). La demi-vie de ER en présence d'antiestrogènes totaux tels que RU58,668 , ICI164,384 et ICI182,780 passe de 4h environ à moins de 1h, tant chez la souris que chez l'humain (Dauvois et al., 1992)(Gibson et al., 1991)(Reese & Katzenellenbogen, 1992).

De plus, des expériences de buvardage de type Northern démontrent que la quantité d'ARNm de ER n'est pas modifiée par la présence d'antiestrogènes totaux. Le niveau de ER dans la cellule n'est donc pas régulé par une inhibition de sa synthèse mais par une altération de la stabilité du récepteur (Dauvois et al., 1993)(Pink & Jordan, 1996). L'addition de CHX dans le milieu n'est pas capable d'enrayer la dégradation de ER induite par ICI182,780, contrairement à celle induite par E<sub>2</sub> (El Khissiin & Leclercq,

1999)(Seo et al., 1998), suggérant un mécanisme de dégradation différent en fonction du ligand. En revanche, CHX inhibe l'agrégation cytoplasmique du récepteur et sa délocalisation, suggérant que ce dernier effet de RU58,668 est dépendant de la synthèse protéique.

Ce phénomène a été observé dans de nombreux types cellulaires, et plusieurs études confirment la diminution drastique du contenu cellulaire en ER, qu'il soit endogène ou transfecté transitoirement. Des cellules humaines ER+ de carcinome mammaire (MCF-7, ZR-75-1) (Dauvois et al., 1992)(El Khissiin & Leclercq, 1999)(Seo et al., 1998) ou ER+ chez la souris (TM4) (Gibson et al., 1991), ainsi que des lignées ER- chez le singe (COS-1) transfectées de manière transitoire (Dauvois et al., 1993) montrent toutes cette réduction du niveau de ER dans la cellule par immunobuvardage de type Western de leur extrait cellulaire total. Par immunocytochimie, il est même possible de visualiser la diminution rapide de ER dans des cellules MCF-7 traitées par RU58,668 et ICI164,384 (Seo et al., 1998). De façon surprenante, les cellules COS-1 et COS-7 transfectées transitoirement avec ER révèlent en immunofluorescence dirigée contre ER une délocalisation de ER dans le cytoplasme en plus de la réduction de la quantité de ER présent dans la cellule. ER apparaît sous forme de petits points dans la région périnucléaire, en faible quantité par rapport à la quantité de ER avant traitement. Les antiestrogènes totaux affectent également la localisation de ER en empêchant le transit vers le noyau de s'effectuer correctement (Dauvois et al., 1993)(Devin-Leclerc et al., 1998). Il se peut que l'annihilation de cette fonction soit responsable de l'accélération du turn-over du récepteur.

Les différentes voies de protéolyse ont été testées pour découvrir celle qui est responsable de la dégradation rapide de ER. Parmi tous les inhibiteurs des voies de dégradation, lysosomale, dépendante des calpains, et protéasomale, seuls les inhibiteurs du protéasome (la lactacystine et l'inhibiteur du protéasome I) sont capables d'empêcher la dégradation de ER induite par RU58,668 (El Khissiin & Leclercq, 1999). Ainsi, tout comme la dégradation induite par les estrogènes, les antiestrogènes totaux semblent entraîner ER dans la voie de protéolyse rapide et ciblée du protéasome.

#### .9.5 *ER $\beta$*

La spécificité tissulaire des effets de E<sub>2</sub> et des antiestrogènes sur la régulation des gènes cible, et la stabilité du récepteur dépend en grande partie des changements conformationnels induits par la liaison du ligand. Ces différentes conformations possèdent des patrons de digestion protéolytique limitée différents. Le groupe de Van Den Bemd a comparé les patrons de ER $\alpha$  et ER $\beta$  en présence d'estrogènes, de Tam, de ICI164,384 et ICI182,780 ER (van den Bemd et al., 1999). Cette étude démontre que ER $\alpha$  et ER $\beta$  répondent à ICI164,384 et ICI182,780 avec des changements conformationnels distincts : la conformation de ER $\alpha$  se modifie en une espèce moins stable et plus sensible aux protéases, tandis que celle de ER $\beta$  devient plus résistante aux protéases, plus stable. Cet effet contraire de ICI164,384 et ICI182,780 sur la stabilité des différentes isoformes de ER n'a pu être observé avec E<sub>2</sub> et Tam qui se comportent de la même manière avec ER $\alpha$

et ER $\beta$ . Ainsi, les composés ICI ont des effets opposés sur la stabilité de ER $\alpha$  et ER $\beta$ . La distribution tissulaire de ER $\alpha$  et ER $\beta$  pourrait être à l'origine du mécanisme qui détermine la spécificité tissulaire des propriétés agonistes/antagonistes des ligands de ER (van den Bemd et al., 1999).

#### .10 Influence du ligand sur la localisation du récepteur dans la cellule

La localisation subcellulaire de ER en présence de différents ligands a été mise en évidence. Après traitement aux estrogènes, ER qui était nucléaire et cytoplasmique se retrouve majoritairement nucléaire (Picard et al., 1990). Si le tamoxifène abolit uniquement la fonction d'activation de la transcription du LBD (AF-2), il n'interfère pas avec la localisation nucléaire de ER. Les composés ICI 182,780 et ICI164,384 sont capables d'inhiber AF-1 (domaine N-terminal de ER), permettent au complexe de se lier à l'ADN mais empêchent le transit nucléo-cytoplasmique (Dauvois et al., 1993). Et plus encore, le composé RU 58,668 va ségréguer ER dans des inclusions cytoplasmiques maintenues uniquement en présence de synthèse protéique (Devin-Leclerc et al., 1998).

## OBJECTIFS

Les différents ligands de ER, agonistes et antagonistes modulent le niveau de récepteur dans la cellule. Cependant, il n'a pas été déterminé s'il existe une corrélation entre l'activité transcriptionnelle de ER et le niveau de ER dans la cellule. De plus, si la dégradation de ER via la voie du protéasome a été mise en évidence en présence de  $E_2$ , la disparition de ER dans la cellule en présence d'antiestrogènes totaux fait toujours l'objet d'une controverse. La dégradation de ER ou son agrégation périnucléaire est-elle responsable de la baisse de niveau de ER détectée dans les extraits cellulaires? Et enfin, il reste à définir quelle(s) région(s) de ER sont importantes pour la dégradation de ER en présence de  $E_2$  ou d'antiestrogènes et l'implication de la structure de ER en présence de ses différents ligands.

Pour répondre à ces questions, nous allons tout d'abord caractériser le niveau de ER dans les fractions solubles de l'extrait cellulaire induit par différents ligands, agonistes, antagonistes partiels et totaux. Nous nous pencherons plus particulièrement sur l'effet du Raloxifène pour lequel la littérature ne fournit aucune donnée. Nous suivrons l'effet des estrogènes, des antiestrogènes partiels Tam, Ral, RU39,411 (RU<sub>p</sub>) et GW273 (GW) et des antiestrogènes totaux RU58,668 (RU<sub>t</sub>), ICI182,780 (ICI), sur le niveau de ER dans la cellule. Nous utiliserons diverses lignées cellulaires ER- transfectées avec ER sauvage (cellules COS-1 et cellules HeLa) ou des lignées ER+ utérines (Ishikawa) ou mammaires (MCF-7). Notre but est de caractériser les cinétiques de disparition de ER observées et d'établir s'il s'agit d'une dégradation via la voie du protéasome.

Puis, nous essaierons de caractériser la dégradation et/ou agrégation de ER en déterminant quelle partie de ER est nécessaire et suffisante pour observer ce phénomène,

Puis, nous essaierons de caractériser la dégradation et/ou agrégation de ER en déterminant quelle partie de ER est nécessaire et suffisante pour observer ce phénomène, et quels acides aminés sont impliqués, grâce à une panoplie de mutants de délétion et de mutants ponctuels.

Finalement, nous essaierons de dégager un consensus reliant la dégradation/agrégation de ER et son activité transcriptionnelle en présence des divers ligands et sa conformation en effectuant des essais de transactivation en présence d'inhibiteurs du protéasome.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

## .1 Constructions

### .1.1 *Mutagenèse Dirigée par PCR*

Les mutants transformant les lysines K362,401,416,449,472,481,492,520,529 et 531 en arginine ont été générés par PCR. Les oligonucléotides utilisés sont dégénérés pour les trois bases codant pour la lysine. La longueur des oligonucléotides a été calculée pour que la température d'hybridation de l'oligonucléotide sur la matrice soit de 60°C avant et après le mésappariement (table 1). Tous les oligonucléotides proviennent de chez GIBCO-BRL.

**Table 1 : séquence des oligonucléotides utilisés pour les réactions de PCR**

Table 1

Nom	Séquence	
ME078	AACAGCCTGGCCTTGTCCCTG	
ME080	AAGAGGGTGCCAGGCTTTGTG	
C-Term BamHI	CATGGATCCGAATTCCAGGGAGCTCTCAG	
K362R	Sens	CACATGATCAACTGGGCGCGCAGGGTGCCAGGCTTTGTG
	Antisens	CACAAAGCCTGGCACCCCTGCGCGCCAGTTGATCATGTG
K401R	Sens	CGCTCCATGGAGCACCCAGTGGGCTACTGTTTGCTCCTAACTTG
	Antisens	CAAGTTAGGAGCAAACAGTAGCCGGACCGGGTGCTCCATGGAGCG
K416R	Sens	CTTGGACAGGAACCAGGGACGATGTGTAGAGGGCATGGTG
	Antisens	CACCATGCCCTCTACACATCGTCCCTGGTTCCTGTCCAAG
K449R	Sens	AGAGGAGTTTGTGTGCCTCCGATCGATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTA
	Antisens	TACACTCCAGAATTAAGCAAATAATCGATCGGAGGCAAACAACTCCTCT
K467R	Sens	CATTTCTGTCCAGCACCCCTGAGGTCTCTGGAAGAGAAAGAC
	Antisens	GTCCCTTCTTCCAGAGACCTCAGGGTGCTGGACAGAAATG
K472R	Sens	CCTGAAGTCTCTGGAAGAGCGGGACCATATCCACCGAGTC
	Antisens	GACTCGGTGGATATGGTCCCCTCTTCCAGAGACTTCAGG
K481R	Sens	ACCATATCCACCGAGTCTCGATCGGATCACAGACACTTTGATCCA
	Antisens	TGGATCAAAGTGTCTGTGATCCGATCGAGGACTCGGTGGATATGGT
K492R	Sens	ACTTTGATCCACCTGATGGCGCGCGCAGGCCTGACCCTGCA
	Antisens	TGCAGGGTCAGGCCTGCGCGCGCCATCAGGTGGATCAAAGT
K520R	Sens	ACATCAGGCACATGAGTAACCGAGGCATGGAGCATCTGTAC
	Antisens	TGTACAGATGCTCCATGCCTCGGTTACCCATGTGCCTGATGT
K529R	Sens	TGGAGCATCTGTACAGCATGCGATGCAAGAACGTGGTGCC
	Antisens	GGGCACCACGTTCTTGCATCGCATGCTGTACAGATGCTCCA
K531R	Sens	ATCTGTACAGCATGAAGTGCCGAAACGTGGTGCCCTCTAT
	Antisens	ATAGAGGGGCACCACGTTTCGGCACTTCATGCTGTACAGAT

Nous avons amplifié un fragment de 876 ou 699 paires de bases en y introduisant la mutation en deux étapes en se servant de pSG5-HEG0 comme matrice .

#### .1.1.1 1<sup>ère</sup> PCR

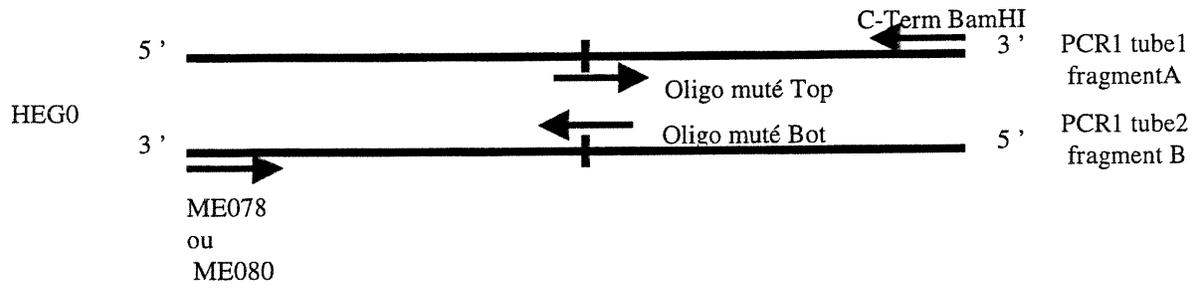
Les premières PCR ont été réalisées avec un oligonucléotide de 20 pb s'hybridant sur le brin 5'-3' de la région E du vecteur HEG0 codant pour ER $\alpha$  appelé ME078 (position 929 à 949) ou ME080 (position 1417 à 1437). Leur température d'hybridation sur la matrice est proche de 60°C. Le deuxième oligonucléotide contient la mutation que l'on désire introduire et s'hybride sur le brin 3'-5' au niveau de la lysine cible. Une autre PCR a été réalisée à partir de l'oligonucléotide contenant cette même mutation mais s'hybridant sur l'autre brin (c'est à dire 5'-3') de la matrice, et un oligonucléotide s'hybridant sur le brin 3'-5' en position C-terminal de HEG0 appelé C-term-BamHI (Tableau 1) (Fig.10).

**Fig.10 : Mutagenèse dirigée par PCR.**

- A) Les premières PCR génèrent deux fragments, un sens et un antisens qui contiennent chacun la mutation introduite. Nous avons utilisé HEGO comme matrice et les oligonucléotides mutés et ME080 ou C-TermBamHI.
- B) les fragments de PCR1 purifiés servent de matrice pour la deuxième PCR qui s'effectue à partir des oligonucléotides ME080 et C-TermBamHI.
- C) le fragment de PCR2 résultant est ensuite purifié puis digéré pour générer les sites de restriction servant à l'introduire dans le vecteur souhaité.

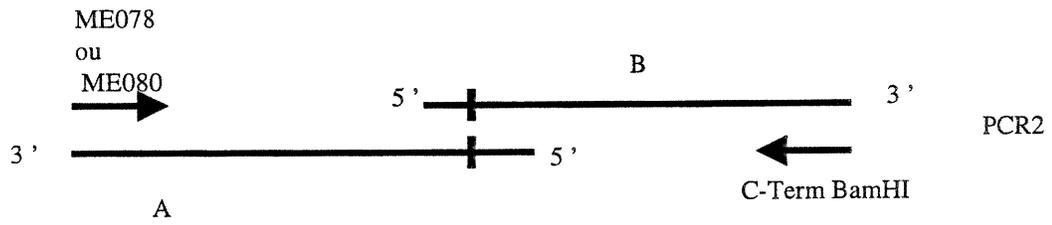
Fig. 10

PCR1

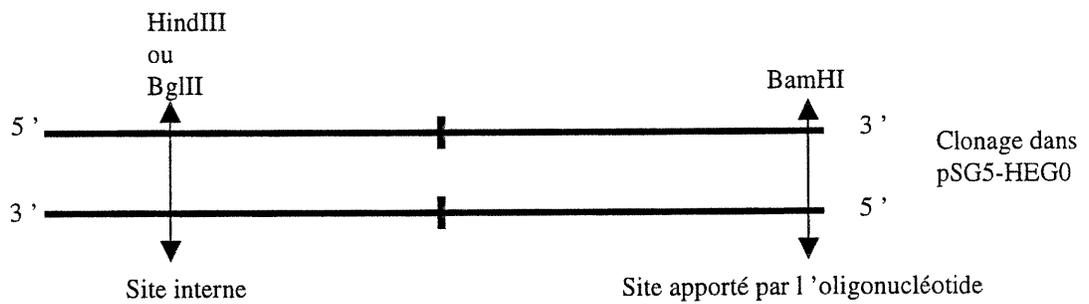


Purification

PCR2



Purification



Les produits de PCR sont ensuite purifiés à partir d'un gel d'agarose préparatif à 2%. Les bandes découpées sont écrasées dans le phénol, gelées à -80°C pendant une nuit, puis l'ADN est purifié par une série de deux extractions phénol-chloroforme, chloroforme. L'ADN est ensuite précipité et resuspendu dans 40 µL de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (0.25 M de Tris pH 8,0 ; 0,25 mM EDTA)

#### .1.1.2 2<sup>ème</sup> PCR

La 2<sup>ème</sup> PCR a été réalisée en utilisant les fragments synthétisés à la 1<sup>ère</sup> PCR purifiés comme matrice 3'-5' et 5'-3'. Nous avons estimé la quantité de ces fragments sur un gel d'agarose analytique. Ils se retrouvent dans les réactions de PCR, à une concentration du même ordre que celle des primers. Les amorces 5'-3' sont ME078 ou ME080 selon la lysine mutée, et l'amorce 3'-5' est C-term BamHI. Les produits de 2<sup>ème</sup> PCR sont ensuite analysés et purifiés comme ceux de 1<sup>ère</sup> PCR.

#### .1.1.3 Composition du Mélange Réactionnel

Pour chaque PCR, on a utilisé 1 unité d'enzyme pfx platinum DNA Polymérase (GIBCO-BRL). Les primers et la matrice sont à la concentration finale de 0,3µM, et les nucléotides à la concentration 2 mM. Le mélange final contient 1mM de MgSO<sub>4</sub>. Le

tampon 10X de l'enzyme pfx platinum DNA Polymérase fournit par le fabricant a été dilué dix fois dans un volume final de 50µL

#### .1.1.4 Cycles de PCR

Le programme de PCR a été conçu pour effectuer une étape d'amorce de la réaction, suivie de 20 cycles d'amplification, et d'une étape de terminaison. La première étape consiste en une dénaturation à 94°C pendant 10 minutes. Chaque cycle est ensuite constitué d'une étape de dénaturation à 94°C d'une minute, d'une étape d'hybridation des oligonucléotides sur la matrice à 60°C pendant 2 minutes, et d'une étape d'élongation à 68°C pendant 10 minutes. Le dernier cycle est suivi d'une étape de terminaison à 68°C pendant 30 minutes et de la conservation du matériel à 4°C.

#### .1.2 *Préparation du Vecteur pSG5-HEG0*

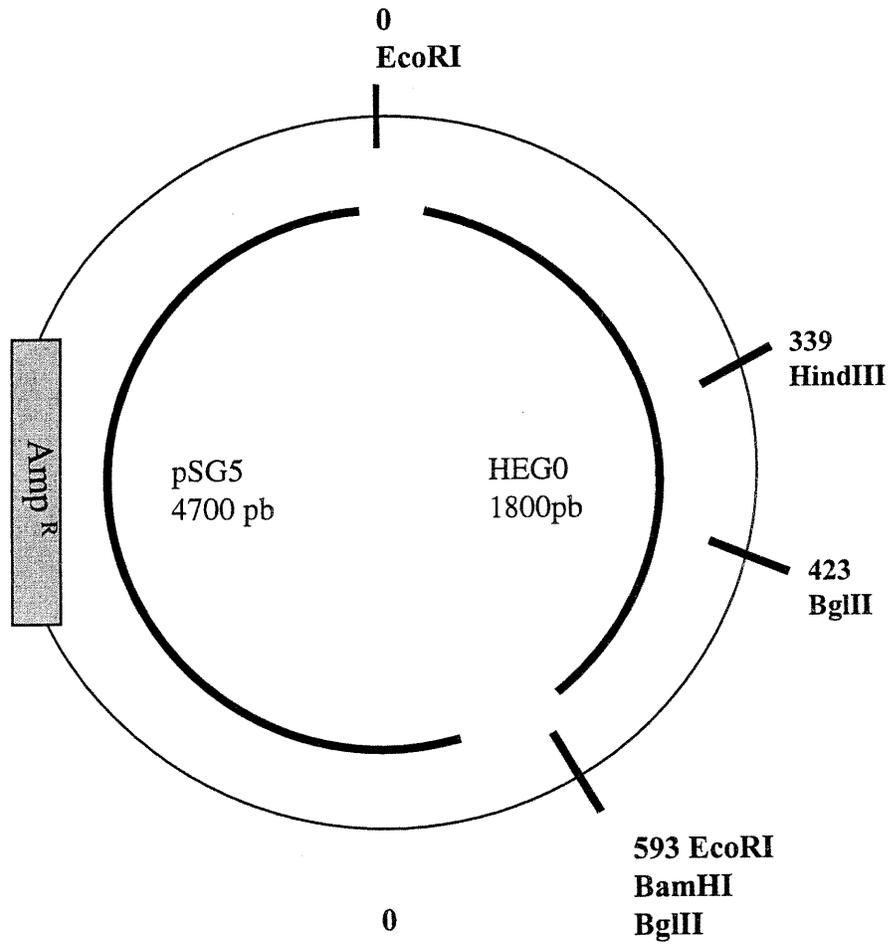
Pour les Lys 362, 401, et 416, les sites uniques HindIII en position 339 et BamHI en position 593 de HEG0 ont été utilisés pour linéariser le vecteur pSG5-HEG0 en excisant un fragment de 876 paires de bases. Le vecteur résultant est un fragment de 5133 pb (Fig.11A).

**Figure 11 : Carte du vecteur pSG5-HEG0.**

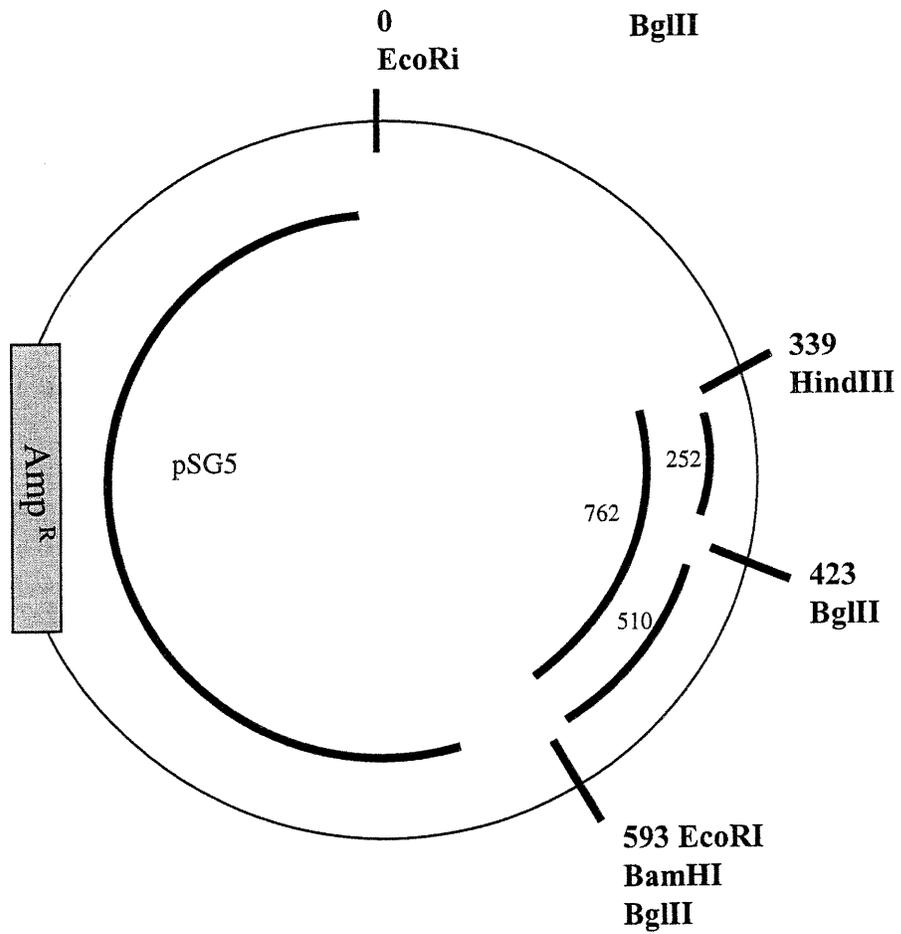
- A) pSG5-HEG0 est composé du vecteur pSG5 de 4700 pb dans lequel est inséré par le site EcoRI l'ADNc de 1788pb codant pour ER, ou HEG0.
- B) Le fragment HindIII/BamHI fait 762 pb alors que le fragment BglII/BglII n'est que de 510pb.

Fig.11

A.



B.



Toutes les enzymes de restriction proviennent de chez MBI-Fermentas, et une unité est utilisée par réaction contenant un maximum de 2 $\mu$ g d'ADN. Les tampons propres aux enzymes sont utilisés suivant les directives du fournisseur. Pour les autres lysines, les sites utilisés sont les sites BglII en positions 423 et 593. Après digestion par BglII, le vecteur linéaire résultant fait 5385 pb. (Fig.11B). Le vecteur est ensuite purifié à partir d'un gel préparatif d'agarose 1%. Les bandes découpées sont écrasées dans le phénol, gelées à -80°C pendant une nuit, puis l'ADN est purifié par une série de deux extractions phénol-chloroforme, chloroforme. L'ADN est ensuite précipité et resuspendu dans 40  $\mu$ L de TE (0.25 M de Tris pH 8, 0, 25 mM EDTA) Le vecteur linéarisé a ensuite été déphosphorylé à chacune de ses extrémités pour éviter qu'il ne se referme sur lui même lors de l'étape de ligation. La Calf Intestinal Phosphatase ou CIP provient de chez GIBCO-BRL et a été utilisée suivant les indications du fabricant.

Le vecteur est ensuite précipité et resuspendu dans du TE afin d'enlever les sels gênant les autres étapes.

### *.1.3 Préparation de l'Insert*

Les fragments de PCR purifiés contenant la mutation ont été digérés par HindIII/BamHI en ce qui concerne les mutations des lysines 362, 401, et 416, et par BglII/BamHI pour les autres. Ces digestions n'enlèvent que quelques paires de base aux extrémités des

inserts qui ont pour taille finale 510 pb et 762 pb respectivement. Le produit des digestions est ensuite purifié à partir d'un gel d'agarose à 2% préparatif, précipité et resuspendu dans 20  $\mu$ L de TE. La concentration de l'insert par rapport à la concentration du vecteur a ensuite été estimée à partir d'un gel d'agarose à 2% analytique.

#### *.1.4 Ligation et Sélection des Clones Positifs.*

La ligation entre le vecteur HindIII/BamHI et les inserts contenant les mutations des lysines en position 362, 401 et 416 a été effectuée avec une unité de Ligase de bactériophage T4 provenant de chez MBI Fermentas, à 16°C pendant 12 h, et dans les conditions de tampon précisées par le fournisseur. On s'est employé à mettre une quantité équivalente de vecteur et d'insert pour optimiser les conditions de ligation. Les vecteurs BglII déphosphorylés et les inserts BglII/BamHI ont été ligués suivant le même protocole. Le vecteur seul a été à chaque fois ligué selon les mêmes conditions afin de servir de témoin du taux de vecteur refermé sur lui-même auquel on doit s'attendre. Les produits de ligation ont ensuite servi à transformer par un choc thermique de 90s à 42°C des bactéries compétentes *E.coli* DH5 $\alpha$ , qui ont alors été étalées sur un milieu solide contenant de l'ampicilline. Le vecteur pSG5 contenant le gène de résistance à l'ampicilline, les colonies ayant poussé possèdent obligatoirement soit le vecteur recircularisé, soit le vecteur ligué à l'insert. Les clones positifs sélectionnés ont ensuite été analysés par séquençage manuel Sanger.

## .2 Culture Cellulaire

### .2.1 *Cellules HeLa*

Les cellules HeLa sont des cellules humaines immortalisées de l'endomètre utérin. Celles-ci sont maintenues dans du milieu de culture DMEM (Life Technologies) complémenté avec 5% de sérum fœtal bovin (Fetal Bovine Serum, FBS en provenance de Life Technologies), contenant 1% de Penicilline-Streptomycine (Gibco BRL) et 1% de Sodium Pyruvate, dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont diluées deux fois par semaine au 1/10<sup>ième</sup>.

### .2.2 *Cellules Cos-7*

Les cellules Cos-7 sont des cellules de singe. Elles sont maintenues dans du milieu de culture DMEM (Life Technologies) complémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (Fetal Bovine Serum, FBS), contenant 1% de Pénicilline et Streptomycine (Gibco BRL) et 1% de Sodium Pyruvate, dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont diluées deux fois par semaine au 1/10<sup>ième</sup>.

### .2.3 *Cellules Ishikawa*

Les cellules Ishikawa sont des cellules immortalisées de l'épithélium utérin humain. Elles sont entretenues dans un milieu  $\alpha$ MEM (Life Technologies) additionné de FBS (Life Technologies) pour une concentration finale de 5%. Le milieu contient en outre 1% de Sodium Pyruvate, et 1% de Pénicilline et Streptomycine. Les cellules sont maintenues dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont divisées à confluence suivant une dilution de 1/10<sup>ième</sup>.

### .2.4 *Cellules MCF-7*

Les cellules MCF-7 sont des cellules de carcinome mammaire. Elles sont entretenues dans un milieu  $\alpha$ MEM (Life Technologies) complétement avec 10% de sérum fœtal bovin (Fetal Bovine Serum, FBS), contenant en outre 1% de Pénicilline et Streptomycine (Gibco BRL) et 1% de Sodium Pyruvate, dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont diluées deux fois par semaine au 1/10<sup>ième</sup>.

### .3 Transfection des cellules

Les cellules sont entretenues dans du milieu DMEM dépourvue de Phénol rouge (milieu blanc) complétement de 5% de FBS traité au charbon actif (Aldrich Chemical Company Inc.), 1% de pénicilline et streptomycine et 1% de Sodium-Pyruvate, deux jours avant la transfection. Deux millions de ces cellules (25% de confluence) pour les HeLa, 1 million pour les Cos-7, 3 millions pour les Ishikawa et 2 millions pour les MCF-7 sontensemencées dans un pétri de 100 mm (Falcon) et transfectées 4 heures plus tard avec 15 µg d'ADN plasmidique par précipitation au calcium phosphate dans du milieu blanc. En bref, l'ADN est resuspendu dans 500 µL final de CaCl<sub>2</sub> 125 mM. Le précipité est formé en mélangeant la solution d'ADN à 500 µL de solution HBS pH 7,14 (HEPES 50 mM à pH 7,05, KCl 10 mM, glucose 12 mM, NaCl 280 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Après 5 min. d'incubation à température ambiante, le précipité de 1 mL est ajouté aux cellules qui sont remises en culture pendant 16 h. Après cette période, le surnageant des cellules est aspiré et remplacé par 10 mL de milieu blanc après que les cellules aient été lavées avec 5 mL de PBS 1X. Les cellules sont remises en culture pendant 24 h dans le milieu blanc dans lequel ont été ajoutés les traitements. Puis les cellules sont récoltées en détachant celles-ci avec une spatule de caoutchouc dans 1 mL de PBS 1X et centrifugées 10 min. à 3500 rpm. Le PBS 1X est aspiré et remplacé par le tampon de lyse.

#### .4 Traitement des Cellules

Les cellules sont stimulées pendant 24 h par les hormones ajoutées dans le milieu et diluées au 1/1000<sup>ième</sup> pour obtenir une concentration finale de  $2,5 \cdot 10^{-8}$  M pour le  $17\beta$  estradiol provenant de chez SIGMA, et de  $10^{-7}$  M pour le 4-hydroxytamoxifen (SIGMA), ICI182,780 (SIGMA), Raloxifène, RU58,668, RU39,411 et GW273 un nouvel antiestrogène (Rhodes, 1969)(gracieusement offerts par P. Vandeveld, Hoechst-Marion-Roussel).

MG132 (SIGMA) est additionné au milieu 1 h avant le traitement avec les hormones à la concentration  $1\mu\text{M}$ . Le traitement avec les hormones durera 16 h après ce prétraitement.

#### .5 Extraction des Protéines

Les cellules sont resuspendues dans 50  $\mu\text{L}$  de tampon de lyse (Tris-HCl 25mM à pH 7,6, NaCl 400 mM, EDTA (disodium ethylenediaminetetra-acetate dihydrate) 5mM, glycérol 20% et différents inhibiteurs des protéases : Aprotinine 2  $\mu\text{g}$  / mL (Sigma), Leupeptine 2  $\mu\text{g}$  / mL (Sigma), Pepstatine 1 $\mu\text{g}$  / mL (Sigma), PMSF 10mM, et DTT 2mM (Sigma), et inhibiteurs de phosphatases: NaV NaF 5mM (Fisher). Après une incubation de 30 min. sur glace, s'en suit une centrifugation à 12500 rpm à 4°C afin de clarifier le lysat protéique. Les concentrations protéiques sont ensuite déterminées par dosage

colorimétrique selon la méthode de micro-BCA (Bicinchoninic Acid, Pierce) en respectant les recommandations du manufacturier.

## .6 Electrophorèse et Transfert des Protéines

### .6.1 *Electrophorèse des Protéines*

Une quantité moyenne de 60 µg de protéines est resuspendue dans un volume approprié de tampon de chargement (Tris 200 mM à pH 6,8, dodécyl sulfate de sodium (SDS) 2%, glycérol 20%, Bleu de bromophénol 0,015%, β-mercaptoéthanol (Sigma) 1.43 M) et dénaturée 5 min. à 90°C. Les protéines sont ensuite chargées sur gel dénaturant de polyacrylamide avec une concentration en polyacrylamide (7,5 %) adaptée à la taille des protéines étudiées. Les gels contiennent une concentration finale en SDS de 10%. La migration est effectuée à 100V en utilisant un appareil électrophorétique de Biorad ("Mini-PROTEAN II") jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol.

### .6.2 *Électrotransfert des Protéines sur Membrane*

Une membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) Immobilon (Millipore) de 10 x 6.5 cm est immergée 30 sec. dans 20 mL de méthanol, rincée une minute dans 20 mL d'eau

millipore, puis équilibrée 5 min. dans 100 mL de solution de transfert (25 mM Tris, 150 mM Glycine, 15% méthanol, ). Le transfert humide est réalisé dans une cuve électrophorétique Biorad, au moyen d'appareils de transfert (Biorad). Le montage "en sandwich" est effectué dans l'ordre suivant : i) Une mousse absorbante (de dimension 7,5x12 cm) saturée en tampon de transfert est déposée du côté de la cathode. ii) une feuille absorbante (papier Watman de dimension 7,5x12 cm) préalablement humidifiée avec la solution de transfert est déposée contre la mousse ; iii) ensuite est déposée le gel, puis la membrane ; iv) sur le gel est mise une feuille absorbante équilibrée dans la solution de transfert, puis une autre mousse saturée en tampon de transfert du côté de l'anode. Le transfert se déroule à un voltage constant (100V) pendant 1 heure.

### .6.3 *Le Buvar dage de Type Western*

La membrane est baignée quelques secondes dans une solution de Rouge Ponceau 1X afin de vérifier le bon transfert des protéines sur la membrane, et la quantité de protéines chargées sur le gel. La membrane est ensuite rincée au moins cinq fois dans 100mL d'eau. Puis elle est équilibrée 10 min. dans 50 mL de TBS, un tampon Tris-salin (Tris-HCl à 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) contenant du Tween à 0.1% (TBST). La membrane est bloquée pendant une nuit dans une solution de TBST contenant 3% de BSA.

#### .6.4 *Immunoblots anti-ER*

Le marquage avec l'anticorps primaire est effectué en incubant la membrane dans un emballage plastique étanche scellé contenant 2mL de solution d'anticorps B10 (dirigé contre la région B de ER) ou F3 (dirigé contre la région F de ER) (Ali et al., 1993) offerts par P. Chambon. 2  $\mu$ L de ces anticorps sont dilués dans du TBST contenant 1,5% de BSA. Le marquage s'effectue pendant une heure à température ambiante. La membrane est ensuite lavée quatre fois dans 50 mL de TBST. Le marquage secondaire est réalisé pendant 20 min. à température ambiante avec un anti-IgG de souris couplé à HRP (péroxydase du raifort). L'anti-IgG générée chez la chèvre (Sigma) est utilisé à une dilution de 1/5000 dans 10 mL de TBST contenant 1,5% de BSA. La membrane est rincée quatre fois dans 50 mL de TBST à raison de 10 min. par rinçage puis une fois dans de l'eau pendant 20 secondes. Le marquage est révélé avec le substrat luminogène de la trousse de chemiluminescence ECL (NEN Life Science Products) puis exposé au contact d'un film X-OMAT (Kodak).

### .7 Essais CAT

#### .7.1 *Extraction des Protéines*

Les cellules sont resuspendues dans 300  $\mu$ L de Tris 0,25 M, pH 8,0, et soumis à trois cycles de gel sur glace sèche pendant 10 minutes et dégel à température ambiante. Le lysat est clarifié par centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min. à 4°C.

### .7.2 *Dosage Colorimétrique $\beta$ Galactosidase*

L'efficacité de transfection a été standardisée grâce au contrôle interne  $\beta$  galactosidase. On a utilisé un volume constant de 50  $\mu$ L (1/6 de l'extrait cellulaire total) auquel nous avons ajouté 800  $\mu$ L de tampon Z (0,06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ; 0,01 M KCl ; 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ; 50 mM  $\beta$  Mercaptoéthanol). Après 10 min d'incubation à 37°C, on ajoute 160  $\mu$ L d'une solution de tampon Z contenant 4mg/ml d'ONPG ( $\beta$ -O-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Bioshop), et on laisse incuber à peu près 20 min. ou jusqu'à développement d'une coloration jaune. La réaction est arrêtée par l'ajout de 400  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M, et la DO lue à 420 nm. La standardisation s'effectue à partir de la valeur de DO la plus basse.

### .7.3 *Essais Enzymatiques CAT (Chloramphénicol acétyltansférase)*

La quantité d'extrait cellulaire a été déterminée grâce au dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase. On ajuste ce volume à 125  $\mu$ L final en y ajoutant du Tris 0,25 M pH 8,0, 0,25  $\mu$ Ci de Chloramphénicol  $^3\text{H}$  (NEN) et 25  $\mu$ g de n-butyryl CoA (SIGMA). Après 1 h d'incubation à 37°C, 300  $\mu$ L de Xylène sont ajoutés. La phase organique est clarifiée, et lavée 3 fois avec 100  $\mu$ L de Tris 0,25 M pH 8,0. 200  $\mu$ L de la phase organique sont

ensuite transférés dans une fiole à scintillation contenant 10 mL de liquide Universol (ICN).

## RÉSULTATS

### .1 Effet des Ligands de ER sur la Quantité de Récepteur Présente dans des Extraits Cellulaires Totaux.

Dans le but d'examiner l'effet des ligands de ER $\alpha$  sur la stabilité de ce récepteur, nous avons transfecté de façon transitoire des cellules HeLa (cellules du cervix de l'utérus n'exprimant pas le ER) avec un vecteur d'expression pour ER $\alpha$ , puis nous avons traité ces cellules pendant 24 h avec l'estradiol, ou avec les antiestrogènes partiels 4-hydroxytamoxifène (OHT), raloxifène (Ral), ou RU39,411 (RU $\rho$ ), ou avec les antiestrogènes totaux ICI 182,780 (ICI) ou RU58,668 (RU $t$ ). Le nouvel antiestrogène GW273 (Rhodes, 1969) a également été testé en parallèle (Fig.12A). Nous avons utilisé les concentrations classiques indiquées dans la littérature. La concentration de E $_2$  est celle où l'activation transcriptionnelle dans notre système est la meilleure et celles des antiestrogènes, les concentrations où ils sont capables d'entrer en compétition avec E $_2$ . Leur affinité pour ER est plus faible que celle de E $_2$ . Les niveaux de récepteur ont été estimés dans des extraits cellulaires par immunoblot en utilisant un anticorps spécifique pour ER $\alpha$  dirigé contre la région B de ce récepteur. Un traitement avec estradiol diminue la quantité de récepteur dans l'extrait cellulaire total d'environ 2 fois par rapport au contrôle (cellules traitées avec éthanol, le solvant de resuspension des hormones), comme préalablement démontré (Alarid et al., 1999)(El Khissiin et al., 2000)(Nawaz et al., 1999). Les antiestrogènes totaux RU58,668 et ICI182,780 entraînent une disparition drastique de ER dans les extraits cellulaires (El Khissiin & Leclercq,

1999)(El Khissiin et al., 2000). D'un autre côté, l'antiestrogène partiel OHT n'induit pas de disparition du ER $\alpha$  et stabilise même le récepteur dans certaines expériences, comme décrit précédemment (El Khissiin et al., 2000). RU39,411, un autre antiestrogène partiel, a également le même effet. Par contre, l'antiestrogène partiel Ral induit une disparition du ER, qui bien que moins marquée que dans le cas de ICI, est plus importante que celle induite par l'estradiol. Finalement, une disparition du récepteur est également observée avec l'antiestrogène GW273, à des niveaux intermédiaires entre ceux induits par E2 et Ral.

Il semble donc que l'effet des antiestrogènes sur la stabilité du récepteur dans les cellules HeLa ne corrèle pas avec leur nature d'antiestrogènes totaux ou partiels, mais reflète peut-être la structure du récepteur en présence de ces différents ligands.

## .2 La Modulation de la Quantité de ER $\alpha$ par les Antiestrogènes est Spécifique au Type cellulaire.

Nous avons également étudié l'effet des antiestrogènes dans une autre lignée cellulaire négative pour le ER $\alpha$ , les cellules COS-1 (Fig. 12A). Dans ces cellules, les différents traitements ne semblent pas affecter de manière aussi frappante la quantité de récepteur transfecté présent dans l'extrait cellulaire total étudié. Seul ICI induit une légère diminution de ER, alors que E<sub>2</sub>, Ral et OHT n'ont pas d'effet. On notera la présence

d'une bande non spécifique de poids moléculaire légèrement inférieur à celui de ER, également présente dans les cellules non transfectées.

**Figure 12 : La disparition de ER des extraits cellulaires induite par les estrogènes ou antiestrogènes dépend du contexte cellulaire.**

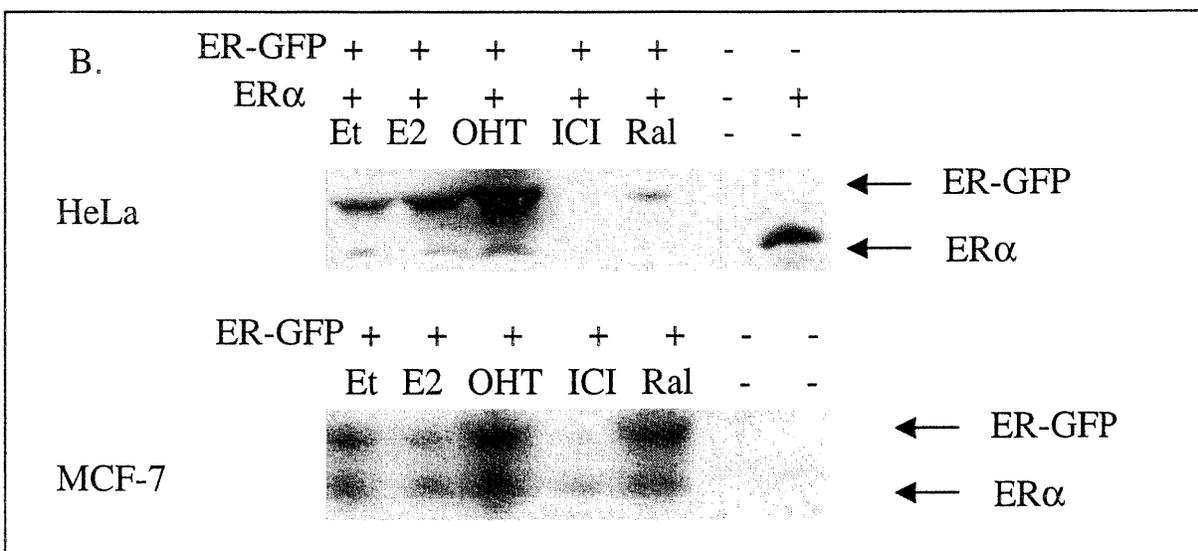
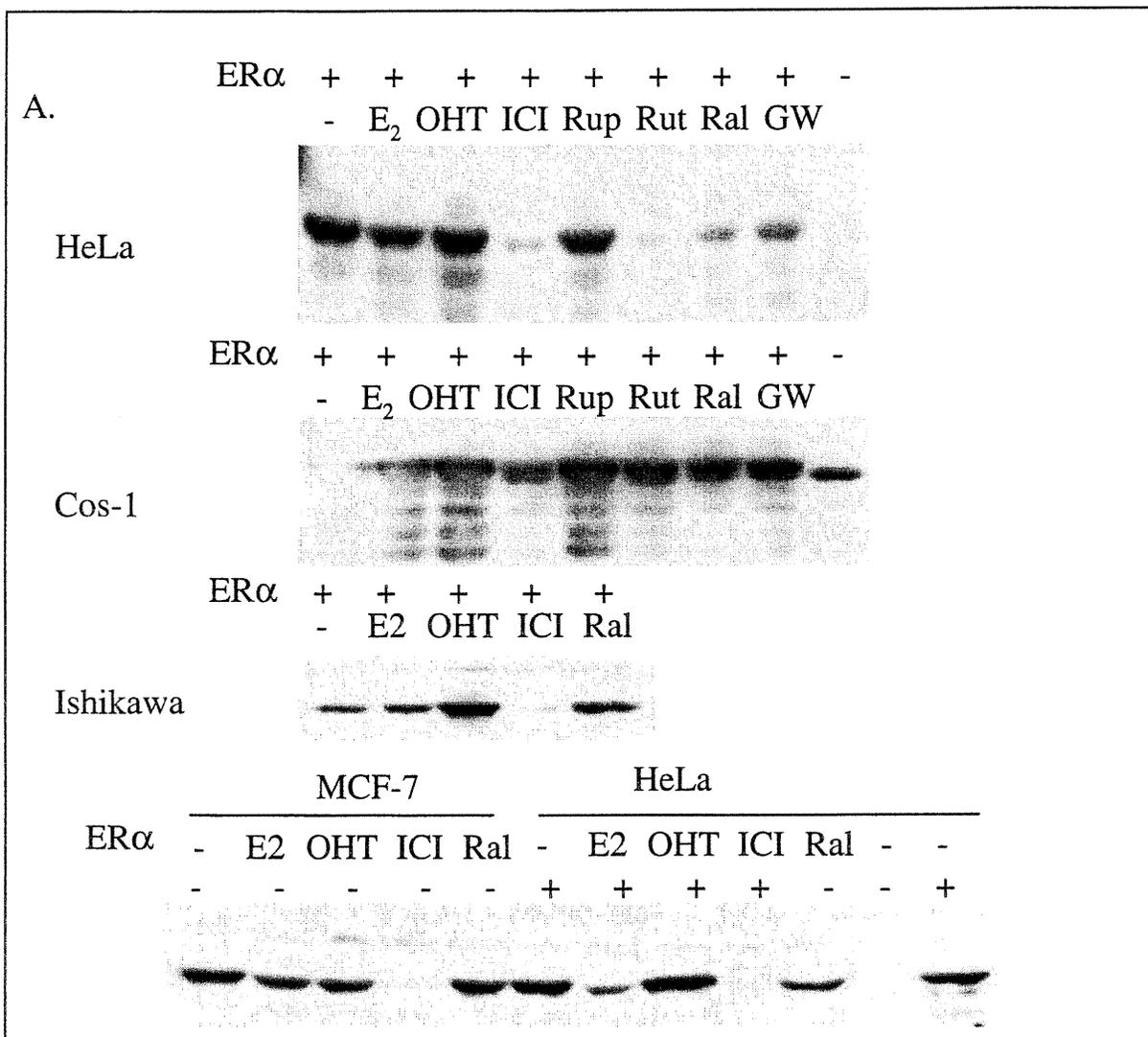
A)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  pSG5-HEG0 (2  $\mu$ g) et subséquemment traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2.5\*10<sup>-8</sup> M) ou avec les antiestrogènes 4-hydroxytamoxifène (OHT), ICI182, 780 (ICI) RU39,411 (RU<sub>p</sub>), RU58,668 (RU<sub>t</sub>), Raloxifène (Ral) ou GW273 (GW, 10<sup>-7</sup> M pour tous les antiestrogènes). Des extraits cellulaires totaux ont été préparés par 3 cycles de congélation-décongélation (glace sèche-glacé) comme décrit dans la section matériel et méthode. La quantité de ER $\alpha$  présente dans les extraits a été analysée par gel SDS-polyacrylamide (8%) suivi d'une analyse de type Western en utilisant l'anticorps B10 (obtenu du Prof. Chambon). Une expérience similaire a également été réalisée dans les cellules Cos-1 (ER négatives). L'effet de E<sub>2</sub> et des antiestrogènes OHT, ICI et Ral a aussi été testé dans les cellules ER-positives MCF-7 (carcinome mammaire) et Ishikawa (carcinome endométrial).

B)

Des cellules HeLa ou MCF7 ont été transfectées avec des vecteurs d'expression de ER $\alpha$  et ER $\alpha$ -GFP, traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI ou Ral, et les extraits cellulaires totaux analysés par immunobuvardage de type Western comme ci-dessus.

Fig.12



Afin de vérifier si les effets observés dans les cellules HeLa peuvent être retrouvés dans des cellules exprimant le ER $\alpha$  de manière endogène, nous avons examiné l'effet de traitements par des antiestrogènes ou estrogènes sur la quantité de ER endogène dans les cellules ER positives Ishikawa et MCF-7 (respectivement cellules utérines et mammaires) (Fig.12A). Presque tous les traitements ont le même effet sur ER $\alpha$  endogène dans les Ishikawa et MCF-7 que sur ER $\alpha$  ectopique dans les cellules HeLa. Seul Ral induit un comportement différent du récepteur dans les cellules HeLa, Ishikawa et MCF-7. En effet, la quantité de ER $\alpha$  ne diminue pas dans les cellules MCF-7 en présence de Ral, les niveaux de récepteur étant comparables à ceux en présence de OHT. Dans les extraits totaux de Ishikawa, Ral a un effet légèrement stabilisateur par rapport à au contrôle négatif mais stabilise moins que OHT (3 fois moins). Donc l'effet de Ral sur la disparition du ER observé dans les cellules HeLa avec du récepteur transfecté n'est pas reproduit sur le récepteur endogène des cellules MCF7 et Ishikawa, mais des différences entre les niveaux de récepteurs en présence de Ral et OHT peuvent être démontrées sur le récepteur non surexprimé.

Pour examiner si les effets de Ral dépendent du niveau d'expression de ER, nous avons transfecté dans les cellules MCF7 et HeLa un vecteur d'expression de ER-GFP, qui exprime une protéine de fusion entre ER $\alpha$  et la green fluorescent protein (GFP) de masse moléculaire totale de 96 kDa. De cette façon, nous avons pu comparer l'effet de Ral sur le récepteur endogène et la protéine de fusion transfectée par analyse qualitative de type Western dans les cellules MCF7 (Fig.12B). Dans ces cellules, la protéine de fusion et le ER $\alpha$  endogène se comportent de la même façon après traitement par Ral,

tandis que la quantité de protéine de fusion est bien diminuée dans les cellules HeLa en présence de Ral. Les différences observées entre les effets de Ral dans les cellules HeLa et MCF7 sont donc dues à des différences de type cellulaire et non au niveau d'expression du ER $\alpha$ .

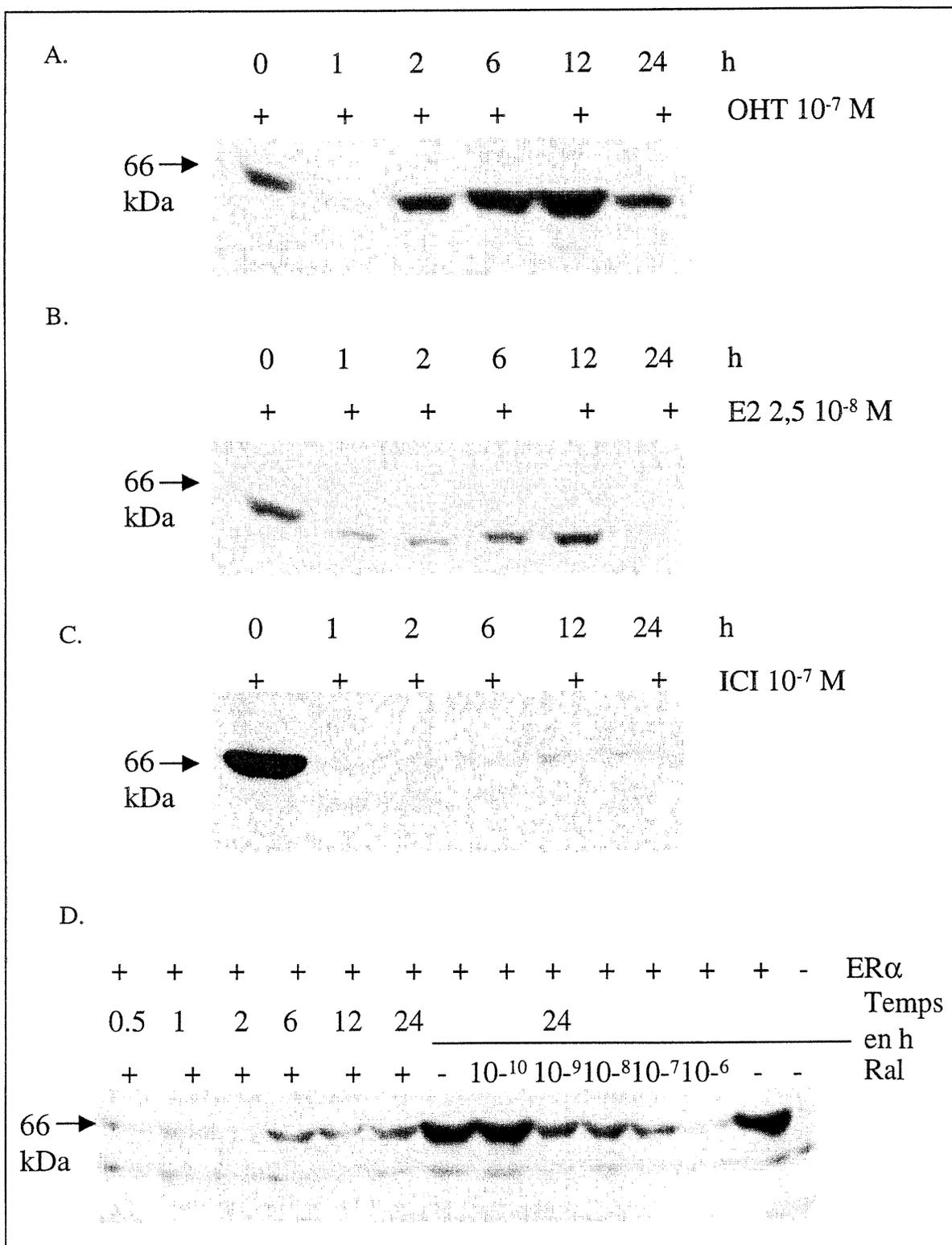
### .3 La Disparition de ER $\alpha$ de l'Extrait Cellulaire en Présence de Ral suit une Cinétique Rapide.

Afin de comparer les cinétiques de disparition de ER $\alpha$  en présence des différents ligands, des cellules HeLa ont été transfectées de manière transitoire avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  et traitées avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI et Ral pour des temps différents. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés par buvardage de type Western (Fig.13). On observe des cinétiques de disparition de ER $\alpha$  différentes en fonction des traitements : estrogènes et antiestrogènes (Fig.13). En présence d'estrogènes, ER disparaît après 2 h de traitement (Fig. 13B) et est maximale à 24 h de traitement, alors que dans le cas d'un traitement avec ICI, on observe une diminution du ER présent des 15 min de traitement . La quantité de ER atteint les niveaux les plus bas à 30 min (Fig. 13C). Malgré la forte similitude structurale entre OHT et Ral, OHT stabilise le récepteur rapidement (30 min, Fig. 13A), alors que dans les mêmes temps, Ral

**Figure 13 : La disparition de ER $\alpha$  induite par le Raloxifène suit une cinétique rapide.**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec pSG5-HEG0, le vecteur d'expression codant pour ER $\alpha$  (2  $\mu$ g) et traitées à différents temps pour obtenir des périodes d'incubation de 1h à 24 h avec E<sub>2</sub> ( $2.5 \cdot 10^{-8}$  M), OHT, ICI ou Ral ( $10^{-7}$  M chacune). Toutes les cellules ont été récoltées simultanément pour éviter des variations de niveaux d'expression du récepteur transfecté. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.13



induit une diminution de la quantité de récepteur dans la cellule (30 min, Fig. 13D) Le récepteur tend à réapparaître au cours du temps. Par exemple, après 24 h de traitement on observe 2 fois plus de ER dans la fraction soluble qu'après 30 min de traitement, suggérant un problème de stabilité de Ral sur cette période. Ceci pourrait aussi expliquer l'effet plus important observé à 24 h en présence de 1  $\mu\text{M}$  Ral alors que la concentration de  $10^{-7}$  M devrait suffire à saturer le récepteur : on peut noter également qu'après 24 h de traitement avec OHT, la stabilisation du récepteur disparaît également, pouvant expliquer la variabilité observée au cours des différentes expériences.

Ainsi, la disparition de ER induite par Ral s'effectue suivant une cinétique proche de celle de la disparition induite par ICI, suggérant un mécanisme de disparition similaire, et peut-être différent de la dégradation induite par la liaison de  $E_2$  au récepteur.

#### .4 La Dégradation Protéasomale est impliquée dans la Disparition de $ER\alpha$ induite par le Raloxifène dans les Cellules HeLa.

Afin de déterminer si la voie de dégradation protéasomale est impliquée dans la disparition de  $ER\alpha$ , nous avons transfecté des quantités croissantes de vecteur d'expression de  $ER\alpha$  (de 0,1 à 2  $\mu\text{g}$ ) dans des cellules HeLa et les avons subséquemment traitées avec Ral pendant 24 h, en présence ou en absence de MG132, un inhibiteur de la sous-unité catalytique 26S du protéasome (Fig.14).

**Figure 14 : La dégradation protéasomale est impliquée dans la diminution de la quantité de ER $\alpha$  induite par Ral.**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des quantités croissantes (de 0,1 à 2  $\mu$ g) de vecteur d'expression de ER $\alpha$ , pSG5-HEG0 (2  $\mu$ g), et traitées pendant 16 h avec Ral ( $10^{-7}$  M) en présence ou en absence de l'inhibiteur du protéasome MG132 (1  $\mu$ M) ajouté deux heures avant l'hormone. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).



En absence de MG132, on observe une disparition de ER $\alpha$  de la fraction soluble en présence de Ral à différents niveaux d'expression du ER $\alpha$ .

En présence de MG132, en revanche, on observe que le niveau de ER dans la fraction soluble en présence de Ral est semblable au niveau du contrôle même si le niveau global de ER $\alpha$  à savoir en présence et en absence de Ral diminue beaucoup (une exposition plus longue a été nécessaire en présence de MG132 pour obtenir des intensités similaires). MG132 semble donc inhiber la diminution de ER $\alpha$  observée dans l'extrait total en présence de Ral, suggérant que le récepteur est dégradé par le protéasome en présence de cet antiestrogène. Notons cependant que MG132 n'abolit pas la diminution du récepteur en présence de ICI dans les mêmes expériences malgré leurs cinétiques de disparition similaires, suggérant des mécanismes de disparition différentes.

Nous avons aussi effectué une compétition entre OHT qui stabilise ER, et Ral qui induit une dégradation, en fixant la concentration de OHT et en ajoutant des doses croissantes de Ral (expérience non montrée). L'ajout progressif de Ral provoque d'abord une perte de la stabilisation puis entraîne le récepteur dans la dégradation lorsque sa concentration est égale à celle de OHT. Notons que l'affinité de Ral et de OHT pour ER sont comparables. Ceci suggère que c'est bien la fixation du ligand au récepteur qui entraîne sa stabilisation ou sa dégradation, et que l'effet des ligands ne serait pas observé sur un récepteur ne possédant pas de domaine de liaison au ligand.

.5 La Région EF est Nécessaire et Suffisante pour observer une Disparition du Récepteur.

Pour déterminer le domaine minimal requis pour observer la dégradation de ER $\alpha$  en présence de Ral, nous avons transfecté dans des cellules HeLa des mutants du ER comportant des délétions dans différentes régions du récepteur.

.5.1 *La Modulation de la Stabilité du Récepteur induite par le Ligand requiert la Présence du Domaine de Liaison au Ligand*

Afin de déterminer si les effets des ligands dépendent du domaine de liaison au ligand du ER $\alpha$ , nous avons utilisé des mutants du ER délétés à partir des acides aminés 366 ou 283. Ces deux mutants sont incapables de lier l'estradiol ou les antiestrogènes (Fig.15A).

Pour ces deux mutants, nous n'avons pas observé d'effet des ligands sur la quantité de récepteur analysée par buvardage Western par rapport au contrôle. (Fig.15B) Ceci confirme la nécessité pour le ligand de se lier au LBD de ER pour affecter la stabilité du complexe.

**Figure 15 : La modulation de la quantité de ER induite par les ligands dépend de la présence du LBD.**

A)

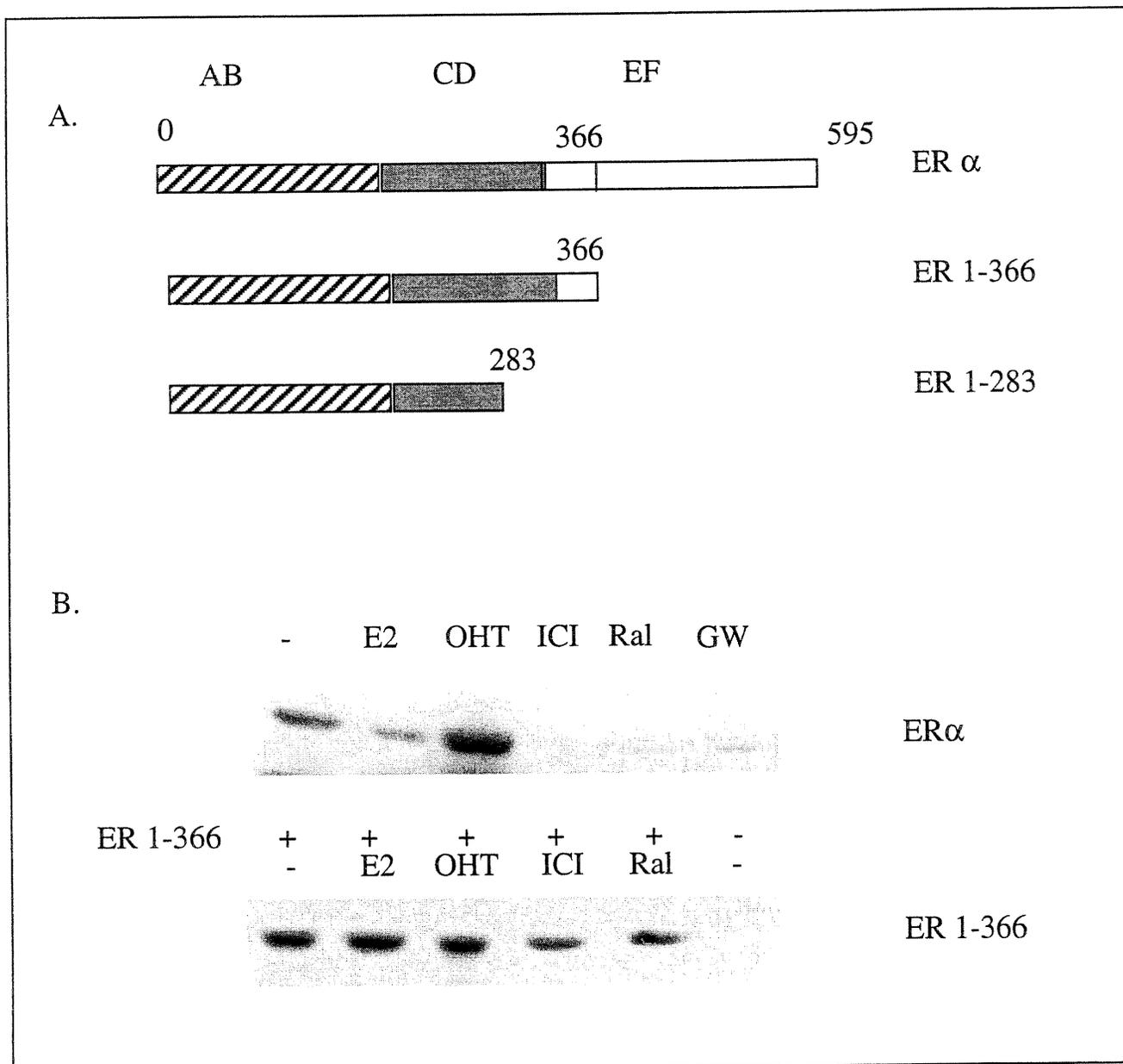
Le vecteur d'expression HEG0 1-366 permet la production d'un récepteur tronqué à partir de l' a.a.366. Il lui manque la région F et une partie de la région E.

Le vecteur d'expression HE15 permet la production d'un récepteur tronqué à partir de l'a.a. 283. Il lui manque les régions E, F et une partie de la région D.

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  ou celui de ER 1-366 (2 $\mu$ g), et traitées pendant 24 h avec Ral (10<sup>-7</sup> M). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.15



.5.2 *La Région EF de ER n'est pas Stable lorsqu'elle n'est pas Complexée à un  
Ligand*

D'autres mutants, cette fois délétés pour la région AB (ER-DEF) ou les régions ABCD (ER-EF) ont été soumis à la même analyse afin d'examiner un rôle potentiel de ces régions dans la modulation des effets des estrogènes ou antiestrogènes. (Fig.16A). Lors de ces expériences, nous avons noté que la région D et le début de la région E interviennent dans la stabilité du récepteur en absence de ligand, puisque pour le récepteur ER-EF, la bande reflétant la quantité de récepteur présente en absence de traitement a presque disparue (Fig.16B). La quantité de protéines chargée dans le puits de contrôle et l'efficacité de transfection ont ici été standardisées grâce à un contrôle interne  $\beta$  Galactosidase, et la disparition de la bande dans le puits de contrôle est significative. On conclura donc à une perte de stabilité du récepteur en absence d'hormones, plutôt qu'à une augmentation relative de la quantité de récepteur avec les autres traitements. Dans le cas de ce mutant, nous comparerons donc les effets des ligands entre eux plutôt que par rapport au contrôle sans ligand.

**Figure 16 : La modulation de la quantité de ER induite par Ral dépend de la présence de la région AB.**

A)

Le vecteur d'expression HEG19 permet la production d'un récepteur tronqué de l'a.a.1 à l' a.a. 262 (délétion des régions A, B et C) ou ER-DEF. Le vecteur d'expression HEG0 366-595 permet la production d'un récepteur tronqué à partir de l' a.a.283 (délétion des régions A, B, C, D et d'une partie de la région E) ou ER-EF.

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$ , ER-DEF ou ER-EF, et traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI, Ral ou GW. L'efficacité de transfection a été normalisée avec un dosage  $\beta$ -galactosidase. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps F3 donné par le Prof. Chambon).



*.5.3 La Perte de Récepteur induite par la Fixation du Raloxifène est Tributaire de la  
Présence des Régions AB et C*

En présence de E<sub>2</sub> ou OHT, les mutants ER-DEF et ER-EF se comportent comme ER sauvage (Fig.16B). En revanche, Ral n'induit plus de perte de récepteur dans les extraits, qu'il s'agisse de ER-DEF ou de ER-EF, sans pour autant aboutir à une stabilisation comme pour OHT. La région AB et la région C semblent donc nécessaires pour obtenir l'effet déstabilisateur de Ral.

*.6 La Disparition de ER est Indépendante des Modifications de l'Activité  
Transcriptionnelle Induites par les Différents Ligands*

*.6.1 La Liaison à Un ERE n'affecte Pas la Stabilité de ER $\alpha$*

La région de liaison à l'ADN ne semble pas impliquée dans la stabilité du récepteur en présence de ligand puisque ER-EF et ER-DEF se comportent de la même façon (Fig.16B). Nous avons donc voulu étudier l'impact direct de la concentration d'éléments de réponse aux estrogènes (ERE) sur le comportement du récepteur sauvage en présence des différents ligands (Fig.17A). Pour ce faire, nous avons cotransfecté un vecteur

rapporteur ERE3-TATA-CAT avec le vecteur d'expression pour ER $\alpha$ . La présence d'un élément de réponse cotransfecté avec ER sauvage n'affecte pas la quantité de ER sauvage présente dans des cellules HeLa qui se comportent de manière peu différentes en présence ou en absence d'un élément de réponse (Fig.17A). La dégradation plus marquée du récepteur en présence d'un ERE, traité avec E<sub>2</sub> est propre à cette expérience et s'est révélée par la suite non reproductible. L'absence de liaison à l'ADN n'entrave pas la dégradation du récepteur en présence d'E<sub>2</sub>, ni la disparition de ER en présence de ICI. L'activation de la transcription de gènes cibles n'est pas ici un évènement déterminant la stabilité des complexes ER-Ligand.

**Figure 17 : La présence d'un ERE ou de coactivateurs n'affectent pas la dégradation de ER.**

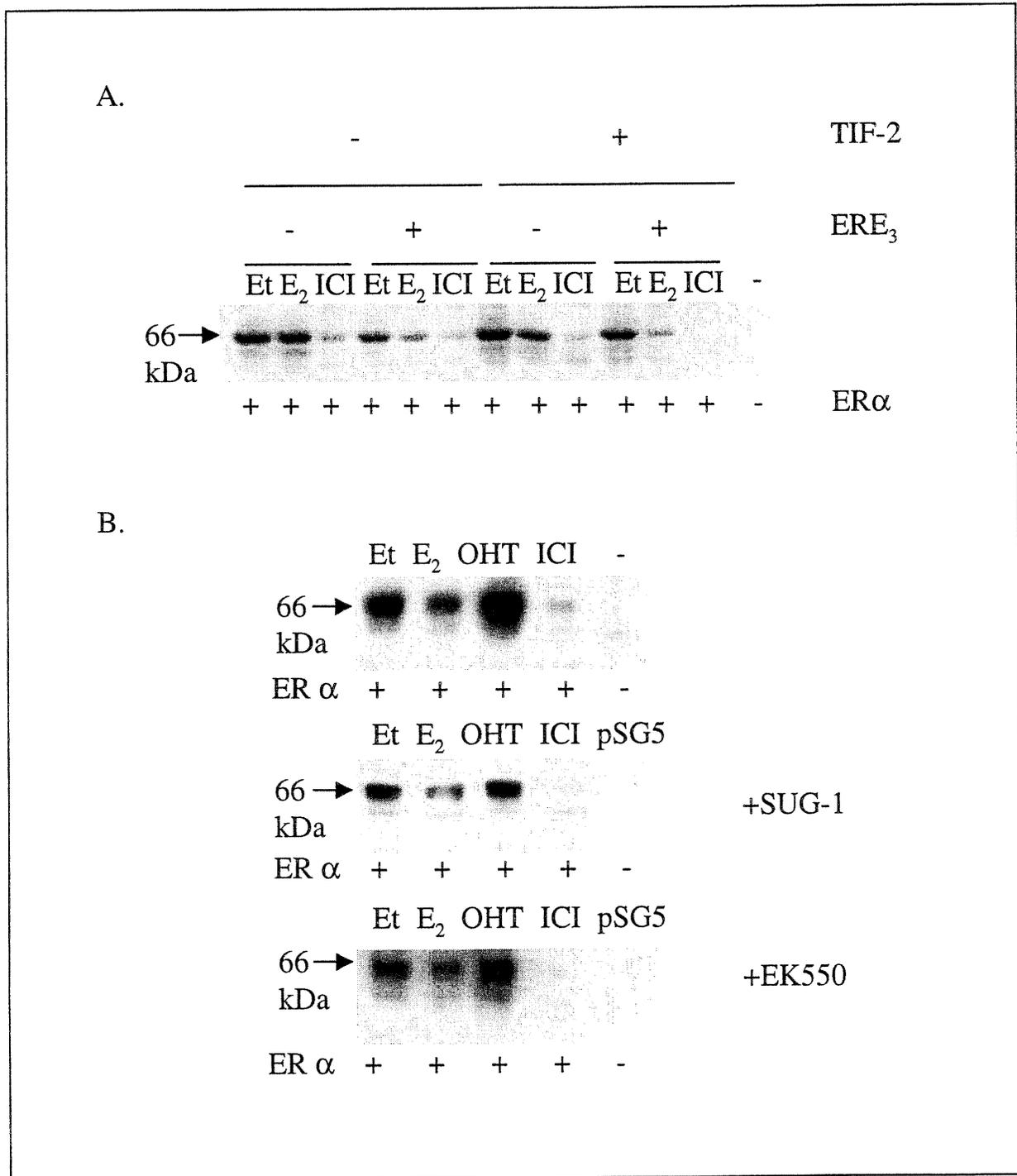
A)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  en présence ou en absence du vecteur d'expression de TIF-2, en présence ou absence d'un élément de réponse ERE<sub>3</sub>. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> ou ICI. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec pSG5-HEG0 (2  $\mu$ g) le vecteur d'expression de ER $\alpha$  en présence ou en absence du vecteur d'expression de SUG-1 et EK550. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> ( $2.5 \cdot 10^{-8}$  M), OHT ou ICI ( $10^{-7}$  M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) et analyse Western (anticorps B10).

Fig.17



*.6.2 Le Recrutement Accru de Coactivateurs ne modifie pas les Activités de  
Dégradation de ER $\alpha$*

Le recrutement de coactivateurs est également impliqué dans la modulation de l'activité transcriptionnelle. Or le groupe de O'Malley (Lonard et al., 2000) a récemment suggéré que les coactivateurs de la famille p160 seraient également dégradés via la voie du protéasome. De plus, SUG-1 est à la fois un coactivateur de ER mais également une sous-unité du protéasome. Le recrutement accru de coactivateurs par ER peut-il stabiliser le récepteur ou au contraire l'entraîner vers la voie de dégradation protéasomale ? Peut-il favoriser ou empêcher des activités d'agrégation ? Pour répondre à ces questions, nous avons cotransfecté TIF-2, SUG-1 et EK 550, un nouveau coactivateur de ER $\alpha$  (données non publiées du Dr. John White), avec ER sauvage (Fig. 17A et B). En absence de cotransfection, les coactivateurs sont à des concentrations non saturantes puisqu'on observe une augmentation de l'activité transcriptionnelle en présence de E2 suite à la surexpression des coactivateurs (expérience non montrée). La présence de EK550, de TIF-2 ou de SUG-1 après 6 h de traitement n'affecte pas la quantité de récepteur présent dans l'extrait chargée sur le gel par rapport au comportement du récepteur en absence de surexpression des coactivateurs. Il semble donc peu probable que les coactivateurs entraînent le récepteur vers la voie de dégradation du protéasome.

.6.3 *Absence de Corrélation entre l'Activité Transcriptionnelle de ER et sa  
Dégradation.*

Certains mutants de ER possèdent une activité constitutive en absence de ligand. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle il n'y a pas de corrélation entre l'activité agoniste et la dégradation de ER, nous avons examiné si un mutant constitutif est plus dégradé en absence de traitement que le récepteur sauvage. Nous avons donc transfecté de manière transitoire deux mutants constitutifs dans des cellules HeLa, HEG0-L536P qui possède une proline à la position 536 (Eng et al., 1998), et HEG0-Y537A, pour lequel une alanine remplace la tyrosine 537 (Weis et al., 1996). Nous avons vérifié qu'en absence de ligand, on observe une activité transcriptionnelle constitutive du même ordre qu'en présence d'E<sub>2</sub> pour ER-L536P, mais un peu moindre pour ER-Y537A (Fig.18A). L'analyse de type Western révèle la présence des ER mutants en quantité équivalente de celle du ER sauvage en absence de ligand (Fig.18B). Nous avons pris soin de vérifier par le contrôle interne  $\beta$ -galactosidase que l'efficacité de transfection entre les mutants était comparable et que la quantité de protéines chargées sur le gel était semblable. Une augmentation de l'activité transcriptionnelle n'est donc pas liée directement à une disparition du récepteur de l'extrait cellulaire.

En ce qui concerne le mutant constitutif ER-L536P (Fig.18B), on n'observe plus aucune dégradation en présence d'estrogènes, ni de disparition de récepteur de l'extrait

protéique lorsque traité avec ICI ou Ral, bien que l'activité transcriptionnelle de ce récepteur en présence d'antiestrogènes totaux ou partiels n'ait pas été modifiée par rapport au récepteur wt ou au récepteur constitutif Y537 (non montré). Donc dans ce cas également la quantité de récepteur en présence d'antiestrogènes ne semble pas refléter l'activité de ces derniers. La conformation du récepteur plutôt que son activité transcriptionnelle semble être à la base de la stabilité du récepteur.

**Figure 18 : L'activité transcriptionnelle de ER ne corrèle pas avec sa dégradation.**

A)

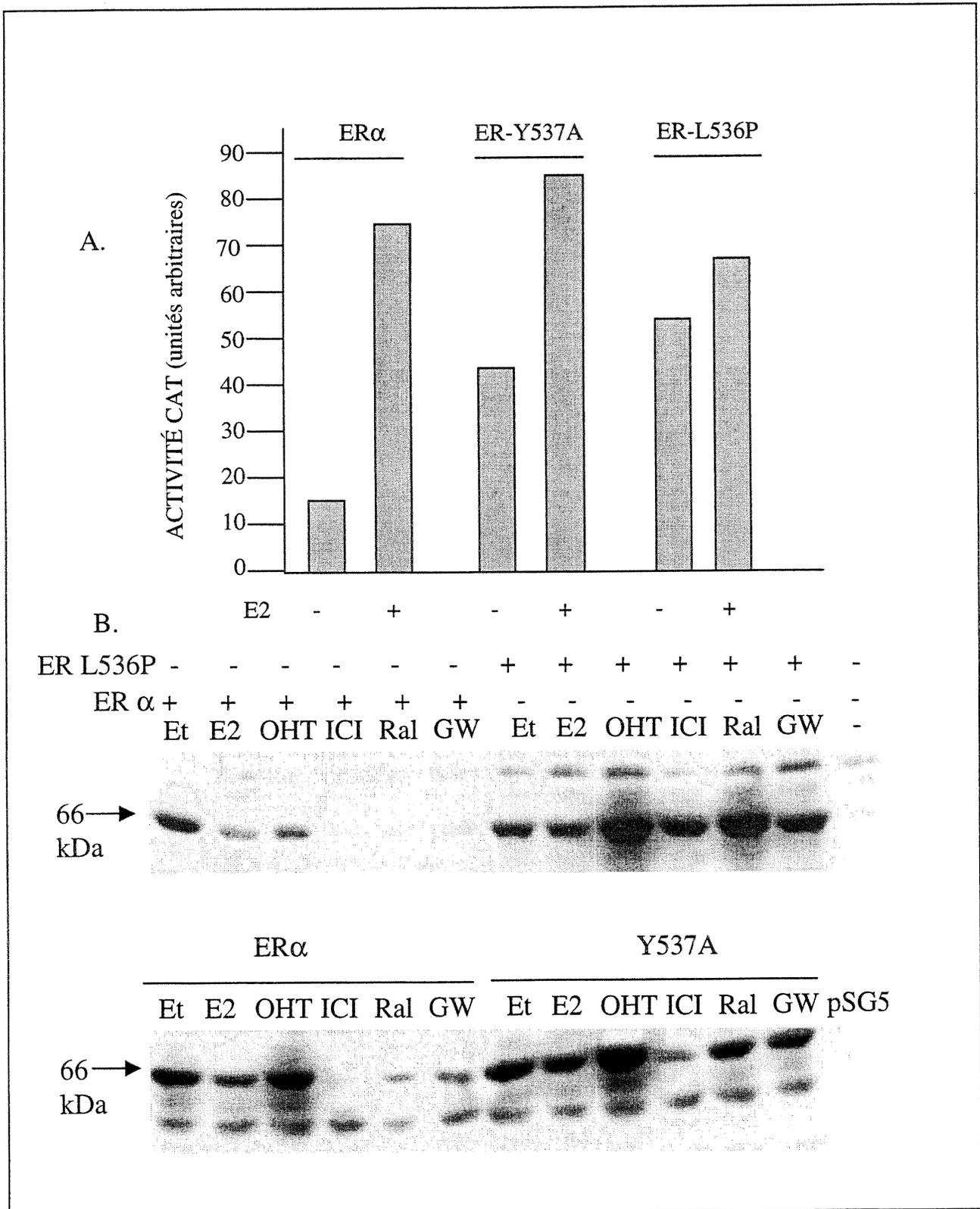
Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$ , de ER-L536P et ER Y537A contenant un gène rapporteur CAT. Les cellules ont été ou non traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>. L'activité transcriptionnelle des mutants a été analysée par un essai CAT après normalisation par un dosage  $\beta$ -Galactosidase.

Les mutants ER-L536P et ER Y537A montrant une activité constitutive.

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$ , de ER-L536P et ER Y537A ou avec le vecteur pSG5 vide comme témoin négatif de l'expression de ER dans les cellules HeLa. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI, Ral ou GW. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.18



## .7 La Position de l'Hélice H12 détermine la Stabilité du Récepteur.

La différence majeure de conformation observée entre les récepteurs complexés à différents ligands se situe au niveau de la position de l'hélice H12 (Brzozowski et al., 1997). L'orientation de cette hélice est modifiée de façon importante par la présence de la chaîne latérale des antiestrogènes. Même entre SERMs de structure proche comme OHT et Ral, la position de cette hélice n'est pas exactement similaire. En présence de ICI, la structure cristallographique de H12 n'a pu être définie, et il semble que cette hélice adopte une conformation flexible.

### *.7.1 La Délétion de l'Hélice H12 Stabilise ER $\alpha$ sans Discrimination pour les Différents Ligands.*

Afin d'examiner si la position de H12 est cruciale pour la stabilité différentielle du récepteur en présence de différents ligands, nous avons donc transfecté transitoirement le mutant ER $\Delta$ H12, délété pour la région de l'hélice H12. Ce mutant est transcriptionnellement inactif en présence de tous les ligands (Fig.19A).

**Figure 19 : La région de l'hélice H12 est déterminante pour la stabilité de ER.**

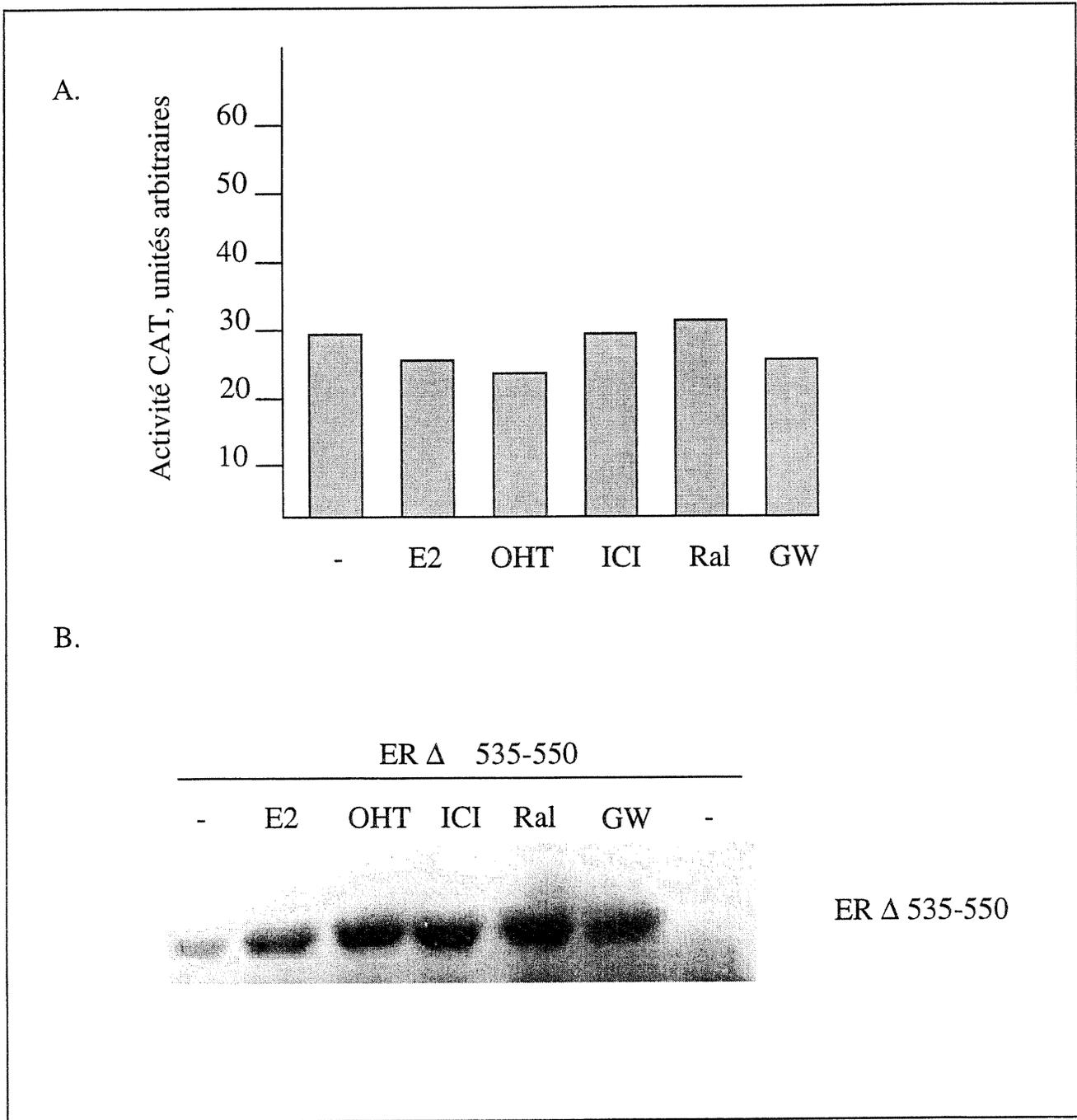
A)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER- $\Delta$ H12 ou ER- $\Delta$ H535-550 contenant un gène rapporteur CAT (0,5  $\mu$ g). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5 10<sup>-8</sup> M), OHT, ICI, Ral ou GW (10<sup>-7</sup> M chacun). L'activité transcriptionnelle des mutants a été analysée par un essai CAT après normalisation par un dosage  $\beta$ -Galactosidase.

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER- $\Delta$ H12. Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5 10<sup>-8</sup> M), OHT, ICI, Ral ou GW (10<sup>-7</sup> M chacun).. Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.19



On n'observe pas non plus de répression de l'activité basale avec un antagoniste. L'analyse par immunobuvardage de type Western révèle que tous les traitements stabilisent le récepteur (Fig.19B), suggérant que la position de H12 joue un rôle important dans la déstabilisation ligand-dépendante du récepteur.

### *.7.2 Les Mutations dans la Région de l'Hélice H12 Affectent la Déstabilisation*

#### *Ligand Dépendante de ER $\alpha$*

Nous avons décidé de tester les mutants de la région de l'hélice H12 dont nous disposons : les mutants L536P, M543-544A, et K362R. Même si ce dernier acide aminé n'est pas proche de l'hélice H12 au niveau de l'enchaînement primaire des acides aminés, la structure secondaire du récepteur l'amène dans son environnement proche en présence d'antiestrogènes partiels. K362 se situe en fait à l'extrémité du sillon de recrutement des coactivateurs, sillon justement occupé par l'hélice H12 en présence de OHT et Ral. L'hélice H12 pourrait donc jouer un jeu de masquage/démasquage de la lysine 362, la rendant accessible en présence de Ral du fait de sa légère rotation vers l'extérieur, mais non en présence de OHT (Fig.20A) (Fig.5 et 6).

**Figure 20 : La mutation des acides aminés 543-544 et 362 modifie la stabilité de ER induite par ses ligands.**

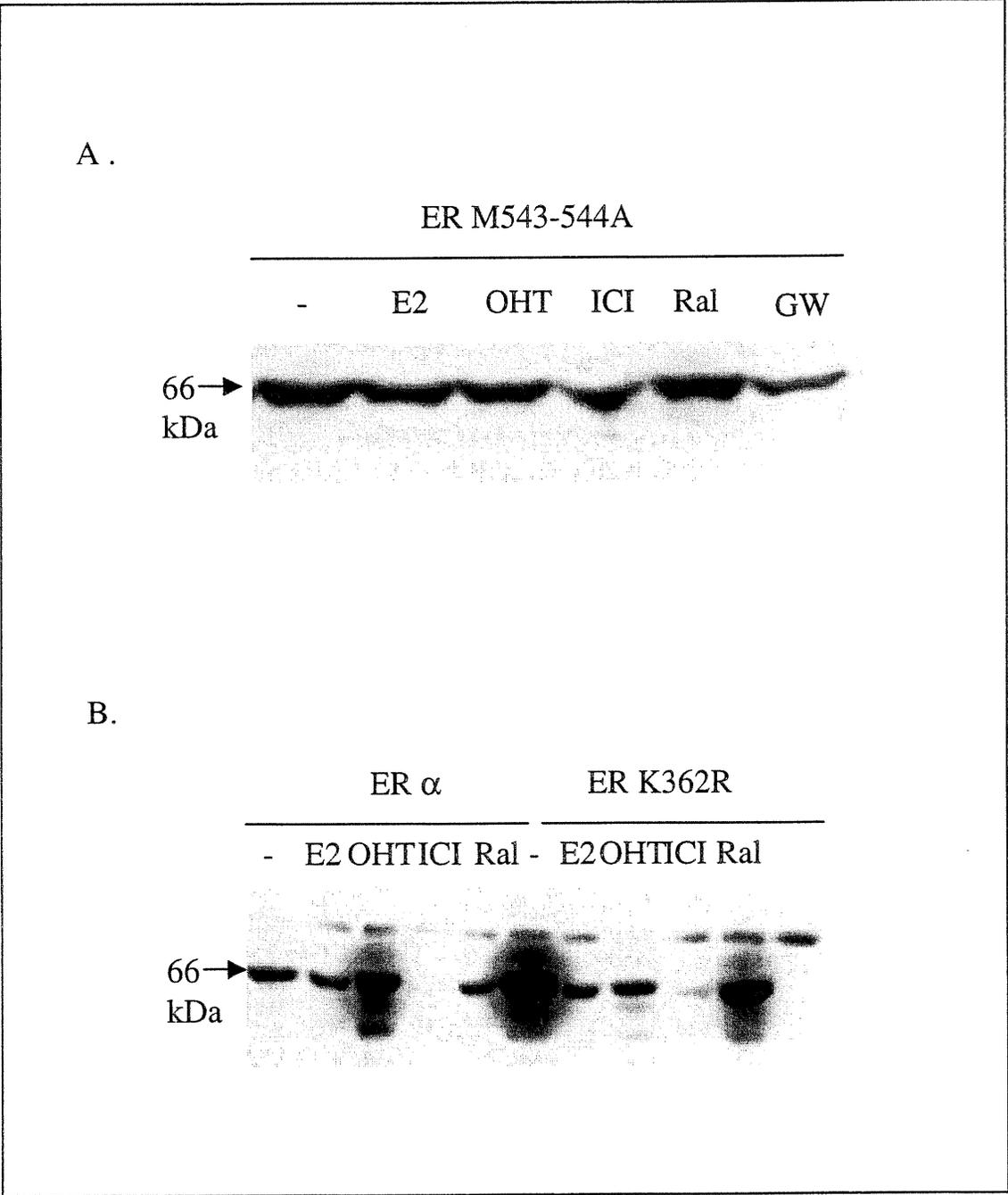
**A)**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER-M534-544A (2 µg). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5 10<sup>-8</sup> M), OHT, ICI, Ral ou GW (10<sup>-7</sup> M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

**B)**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER-K362R (2 µg). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5 10<sup>-8</sup> M), OHT, ICI, Ral ou GW (10<sup>-7</sup> M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.20



Comme nous l'avons vu précédemment (Fig.18B), le mutant L536P n'est plus déstabilisé en fonction des ligands. La proline en position 536 pourrait déplacer l'hélice H12 de sa position normale. Cette observation est donc compatible avec un rôle important de la conformation de H12. Le double mutant M543-544A (Fig.20A) se comporte comme le mutant L536P et est stabilisé indépendamment du ligand. Ces deux acides aminés hydrophobes sont importants pour l'interaction de l'hélice H12 avec le domaine de liaison au ligand du récepteur et leur mutation affecte donc probablement la position de H12 en présence des différents ligands.

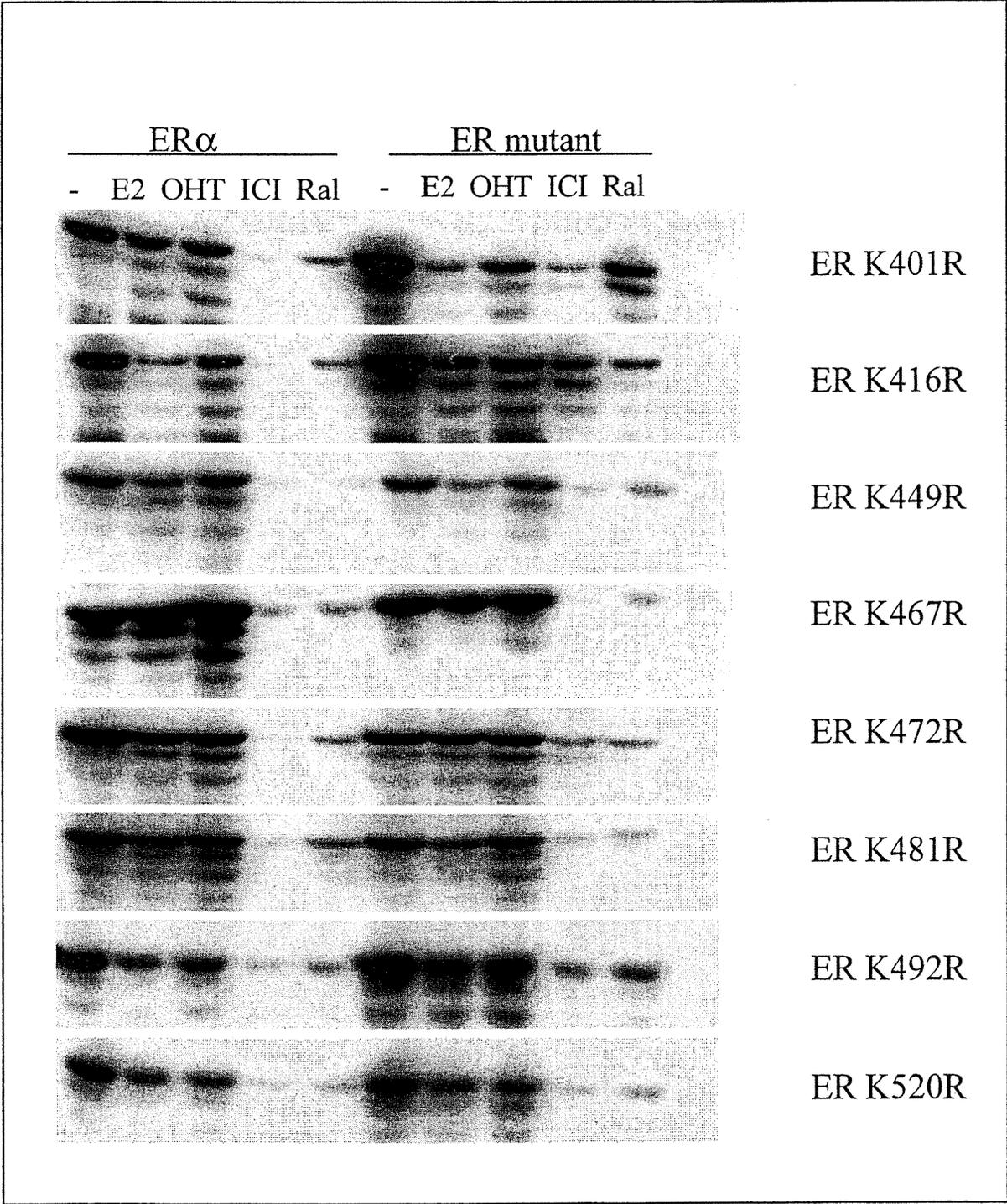
Le mutant K362R est déstabilisé en présence de OHT par rapport au récepteur sauvage tandis qu'il est stabilisé en présence de Ral et en absence de traitement (Fig.18B). Par contre les niveaux de ER ne sont pas affectés en présence de E<sub>2</sub> ou ICI. Ainsi cette mutation modifie le comportement du récepteur en présence de OHT et Ral, mais pas en présence de ICI et E<sub>2</sub>, ce qui corrèle avec le fait que K362 est proche de H12 uniquement dans les structures en présence d'antiestrogènes partiels.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la position de H12 en présence des différents ligands est responsable de la stabilité différente du récepteur.

**Figure 21 : Les mutations K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R n'affectent pas la stabilité de ER.**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  et de ER-K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R (2  $\mu$ g). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5 10<sup>-8</sup> M), OHT, ICI, ou Ral (10<sup>-7</sup> M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.21

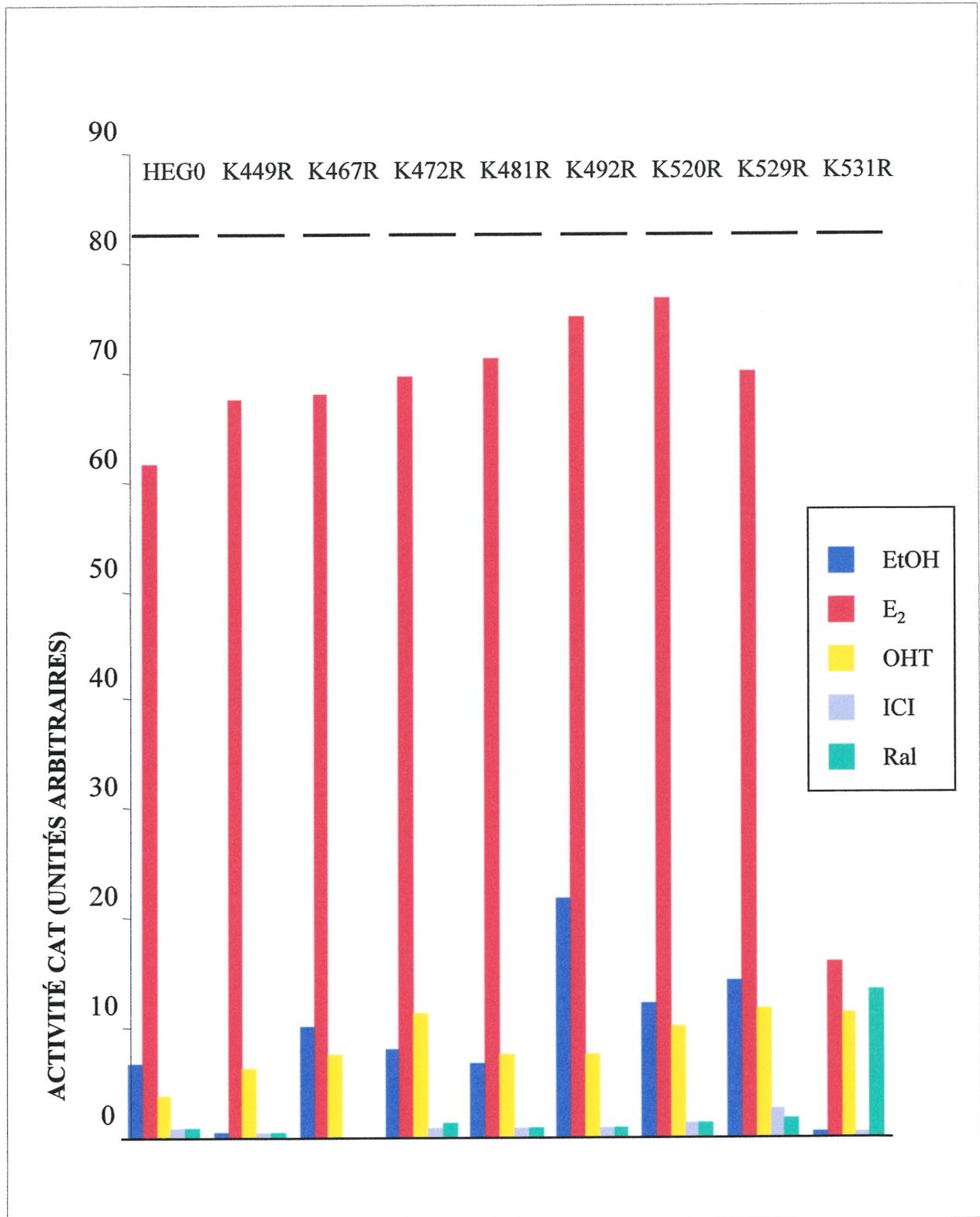


**Figure 22 : Les mutants K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R se comportent tous comme ER $\alpha$  en transactivation.**

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$  et de ER K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R contenant un gène rapporteur CAT (0,5 $\mu$ g).

Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI, ou Ral. L'activité transcriptionnelle des mutants a été analysée par un essai CAT après normalisation avec un dosage  $\beta$ -Galactosidase.

Fig.22



**Figure 23 : Les lysines 529 et 531 sont impliquées dans la dégradation de ER**

A)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER $\alpha$ , de ER-K529R ou ER-K531R contenant un gène rapporteur CAT (0,5  $\mu$ g). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub>, OHT, ICI, ou Ral. L'activité transcriptionnelle des mutants a été analysée par un essai CAT après normalisation par un dosage  $\beta$ -Galactosidase.

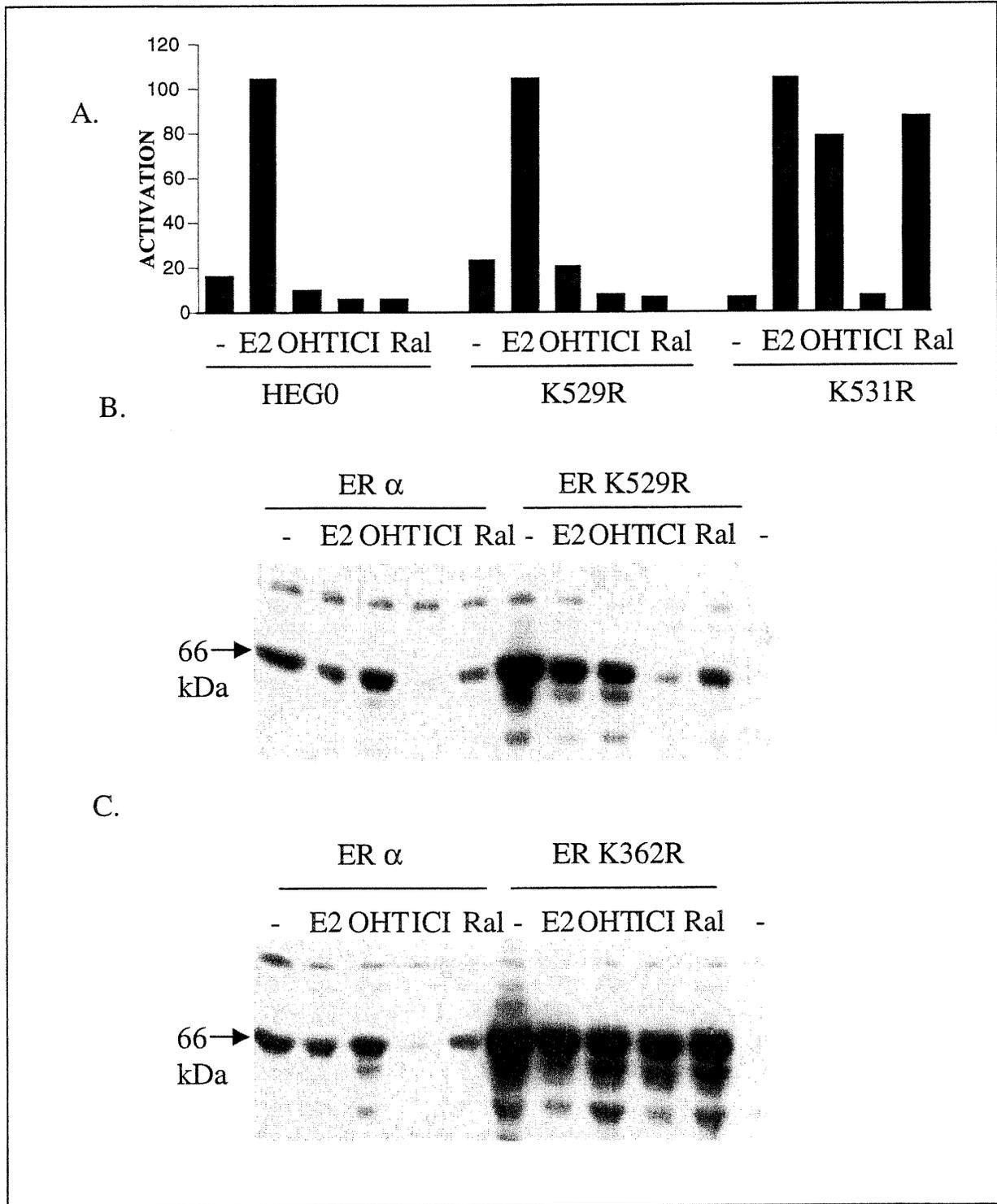
B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER-K529R (2  $\mu$ g). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5  $10^{-8}$  M), OHT, ICI ou Ral ( $10^{-7}$  M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

C)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le vecteur d'expression de ER-K531R (2 $\mu$ g). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec E<sub>2</sub> (2,5  $10^{-8}$  M), OHT, ICI, ou Ral ( $10^{-7}$  M chacun). Les extraits cellulaires totaux ont été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig.23



.8 Les Lysines 529 et 531 sont impliquées dans La Dégradation de ER Induite par les Estrogènes et Antiestrogènes.

La disparition de ER en présence de E<sub>2</sub> et de Ral reflète la dégradation du récepteur via la voie du protéasome (Alarid et al., 1999), (Fig.14). La dégradation protéasomale nécessite l'ubiquitination préalable d'une ou plusieurs lysines par une ubiquitine-protéine ligase. Afin de trouver quelles sont les lysines impliquées dans la dégradation de ER et d'examiner si un même mécanisme est également impliquée en présence des autres ligands, nous avons mutagénisé systématiquement les lysines situées dans le domaine minimum requis pour observer la dégradation en arginine, acide aminé qui a la même charge que la lysine. Nous avons analysé les mutants des lysines aux positions 362, 401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520, 529, et 531, par analyse de type Western et par essai de transactivation. Les mutants K401, 416, 449, 467, 472, 481, 492, 520R se comportent comme ER $\alpha$  en terme de transactivation (Fig.22). Cependant, quelques différences peuvent être remarquées en analyse Western (Fig.21). Certains mutants comme par exemple K401R sont stabilisés en absence d'hormone par rapport au récepteur sauvage. L'effet de ICI est atténué dans certains mutants (K416R, K472R) et celui de Ral est augmenté dans d'autres (K481R). Le mutant K531R, en revanche, a un comportement drastiquement différent (Fig.23). Alors que le mutant K529R est activé comme le récepteur sauvage en présence d'estrogènes et d'antiestrogènes, K531R induit

à la fois une diminution au niveau basal et au niveau de son activation (Fig. 22). Si l'activation par  $E_2$  est de la même amplitude chez ER sauvage et K531R (5-10 fois d'activation par rapport au niveau basal, voir Fig.23A), le niveau atteint ne dépasse pas le niveau basal de  $ER\alpha$  (Fig. 22).  $E_2$ , OHT et Ral activent la transcription au même niveau; il ne semble plus y avoir de discrimination entre agonistes partiels et  $E_2$ . Par contre ICI réprime complètement l'activité du mutant (Fig.22). Par immunobuvardage de type Western, le mutant K531R ne montre plus de variation de la quantité de ER dans l'extrait cellulaire total quel que soit le traitement (Fig.23).

Ainsi, la lysine 531 joue un rôle dans la déstabilisation du récepteur en fonction du ligand, soit comme substrat d'une ubiquitine ligase, soit en modifiant la conformation du récepteur. En effet, on peut remarquer que les a.a.529 et 531 se situent dans le coude qui précède l'hélice H12, et à ce titre peuvent en modifier la position. Il n'est par ailleurs pas exclu que plusieurs lysines participent de concert à l'ubiquitination du récepteur pour le diriger vers le protéasome où il sera dégradé ultérieurement, l'identité des lysines ubiquitinées pouvant potentiellement varier suivant le ligand.

#### .9 Dégradation Versus Agrégation du Récepteur en Présence de Différents Ligands.

La disparition du  $ER\alpha$  des extraits cellulaires totaux peut s'expliquer par une agrégation du récepteur comme par une dégradation. Des agrégats périnucléaires du récepteur ont été observés *in vivo* en présence des antiestrogènes totaux ICI182,780 et RU58,668

(Devin-Leclerc, Meet al. 1998)(Dauvois et al., 1993). Ce mécanisme pourrait expliquer une perte du ER dans les extraits cellulaires solubles (le tampon d'extraction ne contient pas de détergents) associée à une insensibilité aux agents inhibiteurs du protéasomes. Cependant, le ER agrégé devrait alors se retrouver dans la fraction insoluble. Une extraction plus drastique avec des détergents tels que le triton ou le SDS associée à une sonication devrait permettre d'extraire le récepteur (Bence et al., 2001)(Johnston et al., 1998). Nous avons donc repris les culots contenant la fraction insoluble dans un détergent contenant 10% SDS, et les avons soniqué, avant de les faire bouillir pour les dénaturer.

Dans une première expérience, nous avons examiné l'influence d'un traitement par OHT sur la répartition du récepteur entre les fractions solubles et insolubles. En présence de OHT (Fig.24A), on voit la stabilisation progressive du récepteur dans la fraction soluble. Maximale à 12 h, OHT semble perdre son efficacité à 24 h puisque la quantité de ER redevient comparable à celle en absence de traitement. Dans la fraction insoluble, on constate la présence de ER en faible quantité en absence de traitement. OHT semble faire disparaître le récepteur de cette fraction insoluble. Il réapparaît à partir de 6 h de traitement, très progressivement et à mesure que la quantité de récepteur augmente dans la fraction soluble. À 24 h de traitement, la répartition de ER entre la fraction soluble et insoluble est la même qu'en absence de traitement, confirmant une perte d'efficacité de OHT.

**Figure 24 : Absence d'accumulation du ER dans les fractions insolubles des extraits cellulaires totaux en présence d'antiestrogènes totaux.**

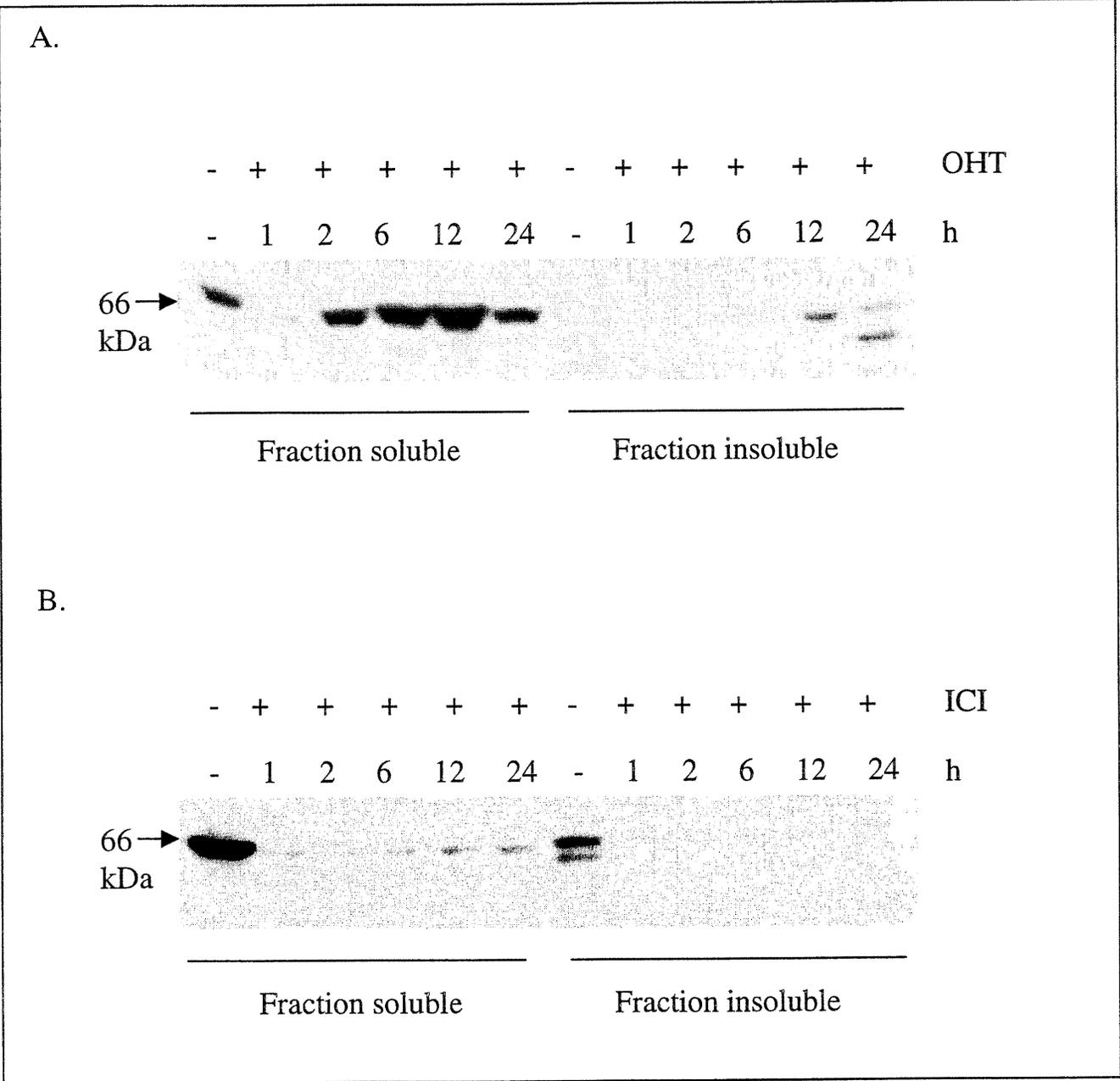
A)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec HEG0 (2 µg), le vecteur d'expression de ERα. Les cellules ont été traitées pendant 1, 2, 6, 12 ou 24 h avec OHT ( $10^{-7}$  M). La fraction insoluble a été récupérée et re solubilisée dans un tampon contenant des détergents et par sonication, puis été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) par buvardage Western (anticorps B10).

B)

Des cellules HeLa ont été transfectées avec HEG0 (2µg), le vecteur d'expression de ERα. Les cellules ont été traitées pendant 1, 2, 6, 12 ou 24 h avec ICI ( $10^{-7}$  M). La fraction insoluble a été récupérée et solubilisée dans un tampon contenant des détergents et et soniquée, puis été analysés sur gel SDS-polyacrylamide (8%) %) par buvardage Western (anticorps B10).

Fig. 24



Un traitement par ICI fait disparaître ER de la fraction soluble très rapidement (moins d'une heure) et reste stable même après 24 h d'incubation à 37° puisque l'absence de ER de la fraction soluble perdure après 24 h de traitement. En revanche, si une faible quantité de ER est présente dans la fraction insoluble en absence de traitement, ICI provoque sa disparition de la fraction insoluble en même temps que de la fraction soluble (Fig.24B). On n'observe pas d'accumulation du récepteur dans la fraction insoluble, ce qui suggère que l'agrégation du récepteur n'explique pas sa disparition de la fraction soluble. Il reste cependant possible que même les conditions drastiques d'extraction utilisées ne parviennent pas à extraire des agrégats de récepteurs. La participation d'autres voies de dégradation comme la voie lysosomale reste également à explorer.

## DISCUSSION

## .1 Effets des Estrogènes et Antiestrogènes sur les Niveaux de ER dans des Extraits Cellulaires Totaux

### .1.1 *Modulation des Niveaux de ER $\alpha$ par les Ligands.*

Les différents ligands de ER peuvent moduler l'activité transcriptionnelle de ER par différents mécanismes. Chaque ligand induit une conformation spécifique du domaine de liaison au ligand du récepteur et module ainsi l'activité transcriptionnelle du récepteur. De plus, les ligands peuvent modifier la stabilité de ER, tel que démontré par l'augmentation ou la diminution de la quantité de ER dans les extraits cellulaires totaux. Par exemple, E<sub>2</sub> déstabilise ER et l'entraîne vers la voie de dégradation du protéasome (Alarid et al., 1999). Les antiestrogènes totaux tels que ICI ou RUt entraînent une perte drastique du contenu des extraits cellulaires en ER (Dauvois et al., 1992), tandis que OHT stabilise ER (Seo et al., 1998). Cette stabilisation est-elle responsable de l'activité agoniste partielle du OHT observée dans l'utérus ? Le Ral étant un antiestrogène dépourvu d'effet agoniste au niveau de l'utérus, il apparaissait intéressant dans cette étude de déterminer l'effet de cet antiestrogène sur la stabilité du ER dans les cellules utérines.

Nous avons donc analysé les effets des divers ligands sur la stabilité de ER transfecté dans les cellules HeLa (cellules de carcinome cervical ER négatives). Nous avons analysé la quantité de ER présente dans les extraits cellulaires totaux et observé que E<sub>2</sub>

entraîne une diminution partielle, ICI une perte drastique et rapide, et OHT une augmentation des niveaux de ER. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature. De plus, nous avons observé que Ral entraîne une diminution importante de la quantité de ER présente dans les extraits cellulaires. Cette diminution est plus rapide que celle induite par E<sub>2</sub> et est comparable en rapidité à celle observée avec les antiestrogènes totaux (ICI ou RUt). Ces différences de cinétique pourraient refléter des mécanismes différents de disparition de ER. Il est possible que la cinétique rapide observée en présence d'antiestrogènes reflète un mécanisme de dégradation rapide et ciblée de protéines mal conformées, alors que la diminution du niveau de ER en présence de E<sub>2</sub> viserait à recycler les éléments de la machinerie transcriptionnelle après l'activation transcriptionnelle.

### *.1.2 La Dégradation de ER induite par les Ligands est Spécifique du Type Cellulaire.*

Les effets des divers ligands, agonistes ou antagonistes, sur la stabilité de ER varient en fonction de la lignée cellulaire utilisée. Alors que Ral induit une diminution de la quantité de ER dans les cellules HeLa, on n'observe pas de diminution de son niveau dans les cellules mammaires MCF-7 ou dans les cellules endométriales Ishikawa. Par contre, OHT, un autre antiestrogène partiel stabilise ER dans tous les modèles cellulaires utilisés. Il reste cependant que les niveaux de ER en présence de Ral sont moins élevés que ceux en présence de OHT, dû à la forte stabilisation du ER par ce dernier dans ces

cellules. Ainsi, il est possible qu'un effet différentiel de ces deux ligands sur la concentration de récepteur permette d'expliquer leurs différents niveaux d'activité agoniste.

À noter aussi que dans les cellules COS-1 (cellules rénales de singe), On n'observe pas de diminution du niveau de ER en présence d'agonistes et d'antagonistes. Nos résultats suggèrent donc la présence de protéines impliquées dans la diminution spécifique du niveau de ER.

La diminution rapide de la quantité de ER présente dans les extraits cellulaires peut refléter deux phénomènes. Soit la dégradation de ER qui aboutit à une baisse de niveau protéique de ER, soit son agrégation et la formation d'agrésomes résistants à notre méthode d'extraction. Ce mécanisme a d'ailleurs été suggéré par les résultats de l'équipe de Catelli (Devin-Leclerc et al., 1998) qui a observé par immunofluorescence l'apparition de corps d'inclusion de ER dans la région périnucléaire de cellules COS-1 en présence de RUt. Ceci pourrait expliquer le fait que nous n'ayons pu observer d'inhibition par des inhibiteurs du protéasome tels que le MG132 et la lactacystine de la dégradation de ER induite par ICI (expériences non montrées), bien que la dégradation de ER par le protéasome en présence d'estrogènes ait été démontrée récemment. Ces résultats corroborent avec la possibilité d'un mécanisme d'agrégation en présence d'antiestrogènes totaux. De plus, la participation de ces deux mécanismes à la disparition du récepteur pourrait varier suivant les cellules, en fonction notamment de la disponibilité de facteurs impliqués dans les voies de dégradation tels que l'ubiquitine libre, les enzymes de l'ubiquitination, et les composantes du protéasome.

### *.1.3 Absence de Corrélation entre les Niveaux de ER et l'Activité Transcriptionnelle.*

La dégradation des facteurs de transcription semble être étroitement associée à leur activité transcriptionnelle. Ceci semble aussi être le cas pour le récepteur des estrogènes en présence d'estradiol. En effet, l'addition de l'inhibiteur du protéasome lactacystine semble diminuer l'activité transcriptionnelle, suggérant que le recyclage du récepteur est indispensable pour son activité transcriptionnelle (Lonard et al., 2000). Nos propres observations avec un autre inhibiteur du protéasome, MG132, confirment ce résultat. Cependant les mutants délétés pour le domaine de liaison à l'ADN (ER-DEF et ER-EF) démontrent la même stabilité que le récepteur sauvage. Donc la liaison à l'ADN, qui est nécessaire pour la transactivation, n'affecte pas la conformation qui détermine la stabilité du complexe ER-ligand. L'activité transcriptionnelle et la dégradation du récepteur seraient donc indépendantes. Ce résultat diffère de celui observé par l'équipe de Mc Donnell (Wijayaratne & McDonnell, 2001) qui a observé que la délétion du domaine de liaison à l'ADN abolit la dégradation par  $E_2$  et la stabilisation par OHT. Cette différence peut être liée à la nature des mutations étudiées. De plus, nous avons observé que la modulation de la concentration en éléments de réponse dans la cellule n'affecte pas la stabilité de ER. Une absence de corrélation entre l'activité transcriptionnelle du ER et sa dégradation en présence de  $E_2$  est également suggérée par l'utilisation de mutants constitutivement actifs, dont la stabilité en absence d'hormone

n'est pas affectée. La conformation du récepteur constitutivement actif lui permet de recruter certains coactivateurs en absence d'hormone (Eng et al., 1998), et de cette manière, également la machinerie transcriptionnelle de base, mais cette conformation n'est pas plus apte à être dégradée pour autant.

Finalement, nous avons examiné si la surexpression de coactivateurs tels que TIF-2, SUG-1 ou EK550 n'affecte pas la dégradation de ER en présence d'agonistes ou d'antagonistes. La surexpression de coactivateurs augmente l'activité transcriptionnelle du ER. De plus, certains coactivateurs comme TIF2 sont eux-mêmes des substrats de la dégradation par le protéasome et pourraient agir comme signal en *trans* de dégradation pour le ER. SUG1 est lui-même une composante du protéasome et pourrait donc recruter le ER au niveau de ce complexe par interaction directe. Cependant, nous n'avons pas observé de modulation de la dégradation de ER par ces différents coactivateurs. Il reste cependant possible que le recrutement de certains cofacteurs soit responsable de la dégradation du récepteur en fonction du ligand. L'ubiquitine-protéine ligase E6-AP est en particulier recrutée par le ER en présence d'estrogènes et agit comme coactivateur. Cependant, la fonction de coactivation de cette protéine ne semble pas dépendante de son domaine ubiquitine ligase.

Si le recrutement de coactivateurs est susceptible de modifier la stabilité du récepteur en présence de coactivateurs, la situation devrait être différente en présence d'anti-estrogènes. En effet, la conformation du récepteur en présence d'antiestrogènes ne permet pas le recrutement de coactivateurs. Par contre, il a été suggéré que des corépresseurs interagissent avec le ER dans la conformation adoptée en présence

d'antiestrogènes. Il serait intéressant de vérifier dans quelle mesure la surexpression de corépresseurs tels que SMRT ou NcoR pourrait affecter la quantité de récepteur présent dans l'extrait cellulaire après différents traitements. Il se pourrait que ces corépresseurs soient eux mêmes dégradés par le protéasome et entraînent le complexe ER-ligand-corépresseur dans cette voie de protéolyse.

## .2 La Dégradation de ER induite par Ral emprunte la Voie Protéasomale

### *.2.1 MG132 inhibe la Dégradation de ER Induite par Ral*

L'inhibiteur du protéasome MG132 empêche la diminution de la quantité de ER dans les extraits totaux en présence de Ral. Ral semble donc induire la dégradation de ER via la voie du protéasome, une voie de dégradation rapide et ciblée d'élimination des protéines, par rapport à la voie lysosomale, lente et constitutive.

Le problème majeur rencontré dans l'utilisation des inhibiteurs du protéasome est la forte mortalité cellulaire qu'ils provoquent dans des laps de temps très courts (dès 6 h de traitement). Or 6 h de traitement est le temps minimum requis pour voir la dégradation induite par E<sub>2</sub> qui nous sert de contrôle. Les extraits cellulaires obtenus après de tels traitements étaient très peu concentrés. Nous n'avons pas pu empêcher la disparition de ER des extraits totaux en présence d'antiestrogènes totaux (expériences non montrées), mais la fiabilité du résultat n'est pas à toute épreuve en raison de la faible concentration

des extraits cellulaires, et on pourrait envisager de refaire ces expériences dans des temps plus courts puisqu'on voit la disparition de ER après seulement 1 heure de traitement par des antiestrogènes totaux. On pourrait également employer des concentrations plus élevées d'inhibiteurs de protéasome pour augmenter l'inhibition. On pourrait encore essayer d'augmenter le taux de transfection en utilisant des méthodes telles que l'électroporation ou la Lipofectamine.

L'implication du protéasome dans la dégradation induite par Ral pourrait être confirmée par l'utilisation d'une souche de cellules thermosensibles possédant une mutation dans une des enzymes impliquées dans l'ubiquitination (Salvat et al., 2000). Un traitement avec Ral devrait entraîner la dégradation de ER à des températures permissives mais non aux températures non permissives.

## *.2.2 Les Ligands de ER n'induisent pas la Formation d'Agrégats Insolubles*

Deux phénomènes peuvent être responsables de la disparition ou diminution de ER de la fraction soluble : soit son passage dans la fraction insoluble, c'est à dire la formation d'agrégats de ER, soit sa dégradation. La dégradation de ER n'exclut pas son agrégation en présence de différents ligands. De plus, des concentrations élevées de récepteurs pourraient favoriser une agrégation par rapport à une dégradation. En conditions de surexpression, il se peut en effet qu'on sature la voie du protéasome. La portion de ER qui n'a pu être dégradée pourrait alors se retrouver au sein d'agrégats. Les résultats du

groupe de Bence vont dans ce sens, en montrant qu'à un faible niveau d'expression d'un mutant du régulateur de la conductance de membrane de la fibrose kystique (CFTR) connu pour être dans une mauvaise conformation reconnue par le protéasome, les cellules HEK293 sont capables de compenser la synthèse par une dégradation protéasomale. En revanche, en conditions de surexpression, ce mutant va former des agrégats qui seront séquestrés dans des corps d'inclusion cytoplasmiques appelés agrésomes (Bence et al., 2001).

En reprenant le culot du lysat cellulaire extrait par un tampon salin (fraction soluble) avec un tampon contenant des détergents, on obtient la fraction insoluble. Nous avons mesuré la quantité de ER dans cette fraction insoluble (agrégats) et nous n'avons pas observé d'accumulation en présence d'antiestrogènes totaux, qui induisent une disparition rapide et presque totale du ER.

Cependant, d'autres résultats dans le laboratoire montrent qu'en présence de Ral et de ICI après 24 h de traitement, la disparition de ER de la fraction soluble s'accompagne de son apparition dans la fraction insoluble dans les cellules HEK293. Ces résultats suggèrent que la disparition de ER serait imputable à un mécanisme d'agrégation plutôt que de dégradation. Il serait donc souhaitable de déterminer si cette différence de résultats est due au type cellulaire ou à des méthodes d'extraction différentes. Il serait donc souhaitable d'essayer une gamme de tampons de force ionique et de stringence différente dans les deux types cellulaires en parallèle.

### .3 Déterminants Moléculaires impliqués dans la Dégradation de ER

#### .3.1 *La Région LBD de ER est Nécessaire à la Dégradation du Récepteur.*

L'effet des différents traitements par estrogènes ou antiestrogènes sur la stabilité du récepteur pourrait être indirect et non dû à la liaison au récepteur, par exemple à cause d'effets sur la traduction du récepteur ou sur la dégradation des protéines en général. Cependant, les effets des antiestrogènes sont observés aux concentrations nécessaires pour lier le récepteur et les effets d'un ligand peuvent être inversés par compétition avec un autre ligand ayant un effet opposé. De plus, la délétion du domaine de liaison au ligand démontre clairement que la fixation au récepteur est requise pour observer l'effet des ligands.

La fixation du ligand provoque un changement de conformation important dans la région EF, qui peut également induire d'autres modifications dans la région AB. Dans le cas de Ral, la région AB est nécessaire à la dégradation. La structure cristallographique en présence de OHT ou Ral (deux antiestrogènes partiels) démontre des différences de structure au niveau de la région EF. Ces différences pourraient entraîner des modifications dans la structure de la région AB dans le cas de ER complexé au Ral. Il est possible que la fixation de Ral expose des lysines supplémentaires dans la région AB et que ces lysines soient des cibles potentielles de l'ubiquitine ligase. L'utilisation des

mutants de délétion de taille variable pour la région AB de ER permettra de vérifier quelle partie de la région AB est impliquée dans cette dégradation.

### *.3.2 La Région de l'Hélice H12 est Importante pour l'Effet des Ligands sur les Niveaux de ER*

Comme on l'a vu précédemment, la différence majeure de structure entre les conformations induites respectivement par estrogènes et antiestrogènes se situe au niveau de la position de l'hélice H12. La structure de H12 diffère aussi légèrement entre les structures du ER en présence de OHT ou de Ral, malgré la similitude générale entre ces deux structures. Le mutant ER $\Delta$ H12, qui ne possède plus l'hélice H12, devrait donc être moins affecté d'un point de vue structurel par la liaison des différents ligands. En absence de l'hélice H12, le récepteur des estrogènes est stabilisé quel que soit le ligand (Pike et al., 1999), suggérant que cette hélice joue un rôle important dans la dégradation ou l'agrégation du récepteur. H12 pourrait avoir une action de masquage/démasquage de lysines substrats d'ubiquitination. Ceci est possible dans le cas de la lysine 362 en présence de OHT ou Ral, puisque la position de cette lysine diffère dans les deux structures. Il est intéressant que la mutation en arginine abolit la diminution de la quantité de ER en présence de Ral et déstabilise le récepteur en présence de OHT sans toutefois affecter la dégradation de ER observée en présence de E<sub>2</sub> et ICI. Cependant, on peut également penser que la modification de conformation amenée par cette mutation,

qui même si elle respecte la charge, ne peut respecter l'encombrement stérique de la lysine de départ, dévie l'hélice H12 de sa position normale en présence de OHT et Ral. Il est possible que l'effet de cette mutation soit dû non pas à la perte d'un site d'ubiquitination mais plutôt à un changement conformationnel au niveau de la position de l'hélice H12. Ce déplacement de l'hélice H12 n'affecterait que le récepteur complexé avec des antiestrogènes partiels tels que Ral et OHT qui amènent l'hélice 12 dans l'environnement de la lysine 362. En présence de ICI, l'hélice H12 ne se trouve pas dans une position définie dans la structure cristallographique. Elle est donc probablement flexible. La lysine 362 se trouve alors loin de l'hélice H12. La position de l'hélice ne sera donc pas affectée par la mutation de la lysine. De même, dans le cas de l'estradiol, l'hélice H12 est géographiquement loin de la lysine 362.

Les mutations L536P et M543-544A modifient probablement la position/conformation de l'hélice H12. En effet, une proline introduit un coude supplémentaire dans la structure, et les alanines modifient à la fois la charge et l'encombrement stérique des a.a. 543 et 544. Ces mutations abolissent également la discrimination entre les ligands au niveau de la dégradation. Il se peut que les mutations de la lysine 531, se trouvant dans la boucle précédant l'hélice H12, affecte la position de cette hélice. En effet, des données cristallographiques suggèrent que cette lysine est impliquée dans un réseau d'interactions stabilisant la conformation active du récepteur. Cependant, il est intéressant de noter que la mutation de la lysine 531 n'augmente pas seulement la stabilité en présence d'agonistes mais stabilise aussi le récepteur en présence

d'antiestrogènes. Il serait donc intéressant de vérifier si cette lysine est un substrat d'ubiquitination ou si son rôle est purement structurel.

Il semble donc que plusieurs mutations susceptibles d'affecter la position de l'hélice H12 stabilisent le récepteur. Ces changements dans la position de l'hélice H12 pourraient cacher ou démasquer plusieurs lysines impliquées dans le phénomène de dégradation protéasomale, comme les lysines 362 ou 531. Une autre explication pourrait être le recrutement de protéines spécifiques en fonction de la conformation du récepteur. Finalement, l'exposition de certains résidus hydrophobes dans l'hélice H12 (comme M543-L544) pourrait entraîner l'agrégation du récepteur.

### *.3.3 La Lysine 531 est-elle impliquée dans la Dégradation Protéasomale de ER?*

L'ubiquitination des protéines se fait au niveau des résidus lysines. Nous avons démontré que la mutation des lysines 362 et 531 de ER abolit la dégradation du récepteur. Il est donc possible que ces lysines soient des substrats de l'ubiquitine ligase. La mutation de la lysine 531 affecte la dégradation de ER en présence de E<sub>2</sub>, ICI et Ral alors que celle de la lysine 362 n'affecte que la dégradation en présence de Ral. Ceci suggère des différences possibles au niveau de l'ubiquitination en fonction du ligand. On ne sait si plusieurs lysines peuvent être ubiquitinées, et si le nombre de lysines détermine le degré de dégradation de ER, ou si la structure du récepteur modifie la cinétique d'ubiquitination d'une même lysine quel que soit le ligand.

Le groupe de McDonnell a mis en évidence l'existence d'une forme de ER hyperubiquitinée en présence de ICI et suggère que le taux de dégradation varie en fonction du niveau d'ubiquitination du récepteur (Wijayaratne & McDonnell, 2001). Il serait donc intéressant de vérifier si en présence de Ral on observe une ubiquitination du récepteur et si la mutation en arginine des lysines 531 et 362 est capable d'abolir ces ubiquitinations en supprimant la/les lysine(s) substrat de l'ubiquitine-protéine ligase. Ces expériences pourraient être réalisées en cotransfectant un vecteur d'expression pour une ubiquitine liée à 6 histidines avec le vecteur d'expression pour ERa dans les cellules HeLa, puis en purifiant le récepteur ubiquitiné sur colonne d'affinité au nickel. Les mêmes expériences menées avec le récepteur sauvage et les mutants affectés aux différentes lysines devraient confirmer si ces résidus sont impliqués dans l'ubiquitination du récepteur.

## CONCLUSION

Outre la modulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur des estrogènes, divers mécanismes semblent participer à la régulation de son activité. La modulation de la quantité de récepteur disponible pour la transactivation est probablement un mécanisme important de modulation de l'intensité et de la durée de la réponse aux différents ligands. Nos résultats ont permis de démontrer que différents antiestrogènes ont un impact variable sur la stabilité du ER attribuable directement à la liaison au récepteur, et que ces effets sont histospécifiques. Ce mécanisme pourrait être à la base de l'activité utéro-trophique différentielle observée avec les antiestrogènes partiels Tamoxifène et Raloxifène. Nous n'avons pas observé de corrélation directe entre les niveaux d'activité transcriptionnelle du récepteur et sa dégradation. Par contre, nos résultats suggèrent que la structure du récepteur et en particulier la conformation de l'hélice H12 est importante pour le contrôle des niveaux de ER. Des expériences de mutation ponctuelle sur des lysines à proximité de l'hélice H12 nous démontrent que certaines lysines spécifiques sont impliquées dans la dégradation de ER par différents ligands, potentiellement par des effets conformationnels ou en tant que substrats directs des ubiquitine-protéines ligases. Les perspectives futures pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de la stabilité du ER en fonction des différents ligands incluent une analyse de la contribution respective de l'agrégation et de la dégradation du récepteur en présence de différents ligands et dans des types cellulaires différents. Il nous reste aussi à déterminer quelles lysines dans le domaine de liaison au ligand sont des sites d'ubiquitination, et à déterminer si les cinétiques différentes de dégradation induites par les différents ligands reflètent le recrutement de différents facteurs responsables de la dégradation du

récepteur, comme par exemple des ubiquitine-ligases reconnaissant des conformations spécifiques du récepteur.

Une analyse détaillée des mécanismes de dégradation du récepteur des estrogènes par ses différents ligands est essentielle pour mieux comprendre l'aspect dynamique de la réponse à ces ligands. De plus, ces études permettront d'éclaircir les raisons de l'activité différentes d'antiestrogènes dans leurs tissus cibles, et sont cruciales pour la conception rationnelle d'antiestrogènes optimaux pour le traitement du cancer du sein.

## RÉFÉRENCES

1. Alarid, E.T., Bakopoulos, N., and Solodin, N. (1999a). Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol.Endocrinol.* *13*, 1522-1534.
2. Alarid, E.T., Bakopoulos, N., and Solodin, N. (1999b). Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol.Endocrinol.* *13*, 1522-1534.
3. Ali, S., Lutz, Y., Bellocq, J.P., Chenard-Neu, M.P., Rouyer, N., and Metzger, D. (1993). Production and characterization of monoclonal antibodies recognising defined regions of the human oestrogen receptor. *Hybridoma* *12*, 391-405.
4. Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J.* *12*, 1153-1160.
5. Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H., and Notides, A.C. (1994). Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol.Endocrinol.* *8*, 1208-1214.

6. Bachmann-Moisson, N., Barberi-Heyob, M., and Merlin, J.L. (1997). [Molecular aspects of different mechanisms of tamoxifen resistance]. *Bull.Cancer* 84, 69-75.
7. Beato, M., Truss, M., and Chavez, S. (1996). Control of transcription by steroid hormones. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 784, 93-123.
8. Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292, 1552-1555.
9. Benecke, A., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (2000). Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep.* 1, 151-157.
10. Biola, A. and Pallardy, M. (2000). [Mode of action of glucocorticoids]. *Presse Med.* 29, 215-223.
11. Bocchinfuso, W.P. and Korach, K.S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 2, 323-334.
12. Bocchinfuso, W.P., Lindzey, J.K., Hewitt, S.C., Clark, J.A., Myers, P.H., Cooper, R., and Korach, K.S. (2000). Induction of mammary gland

- development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* *141*, 2982-2994.
13. Borrás, M., Hardy, L., Lempereur, F., el Khissiin, A.H., Legros, N., Gol-Winkler, R., and Leclercq, G. (1994). Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* *48*, 325-336.
  14. Borrás, M., Laios, I., El Khissiin, A., Seo, H.S., Lempereur, F., Legros, N., and Leclercq, G. (1996). Estrogenic and antiestrogenic regulation of the half-life of covalently labeled estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* *57*, 203-213.
  15. Borrás, M., Laios, I., El Khissiin, A., Seo, H.S., Lempereur, F., Legros, N., and Leclercq, G. (1996). Estrogenic and antiestrogenic regulation of the half-life of covalently labeled estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* *57*, 203-213.
  16. Brunner, N., Boysen, B., Jirus, S., Skaar, T.C., Holst-Hansen, C., Lippman, J., Frandsen, T., Spang-Thomsen, M., Fuqua, S.A., and Clarke, R. (1997). MCF7/LCC9: an antiestrogen-resistant MCF-7 variant in which acquired resistance to the steroidal antiestrogen ICI 182,780 confers an early cross-resistance to the nonsteroidal antiestrogen tamoxifen. *Cancer Res.* *57*, 3486-3493.

17. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
18. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
19. Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J.* 4, 3131-3135.
20. Catelli, M.G., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., and Cadepond, F. (1999). [Functional interaction of HSP90 with steroid receptors]. *J.Soc.Biol.* 193, 361-367.
21. Chander, S.K., McCague, R., Luqmani, Y., Newton, C., Dowsett, M., Jarman, M., and Coombes, R.C. (1991). Pyrrolidino-4-iodotamoxifen and 4-iodotamoxifen, new analogues of the antiestrogen tamoxifen for the treatment of breast cancer. *Cancer Res.* 51, 5851-5858.

22. Chlebowski, R.T., Collyar, D.E., Somerfield, M.R., and Pfister, D.G. (1999). American Society of Clinical Oncology technology assessment on breast cancer risk reduction strategies: tamoxifen and Raloxifène. *J.Clin.Oncol.* *17*, 1939-1955.
23. Chlebowski, R.T. and McTiernan, A. (1999). Elements of informed consent for hormone replacement therapy in patients with diagnosed breast cancer. *J.Clin.Oncol.* *17*, 130-142.
24. Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A.L. (2000a). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications. *J.Cell Biochem.Suppl* *34*, 40-51.
25. Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A.L. (2000b). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: Mode of action and clinical implications. *J.Cell Biochem.* *77*, 40-51.
26. Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A.L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* *22*, 442-451.
27. Clarke, R., Hilakivi-Clarke, L., Cho, E., James, M.R., and Leonessa, F. (1996a). Estrogens, phytoestrogens, and breast cancer. *Adv.Exp.Med.Biol.* *401*, 63-85.

28. Clarke, R., Skaar, T., Leonessa, F., Brankin, B., James, M., Brunner, N., and Lippman, M.E. (1996b). Acquisition of an antiestrogen-resistant phenotype in breast cancer: role of cellular and molecular mechanisms. *Cancer Treat.Res.* 87, 263-283.
29. Collingwood, T.N., Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J.Mol.Endocrinol.* 23, 255-275.
30. Dace, A., Zhao, L., Park, K.S., Furuno, T., Takamura, N., Nakanishi, M., West, B.L., Hanover, J.A., and Cheng, S. (2000). Hormone binding induces rapid proteasome-mediated degradation of thyroid hormone receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 8985-8990.
31. Dauvois, S., Danielian, P.S., White, R., and Parker, M.G. (1992a). Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 4037-4041.
32. Dauvois, S., Danielian, P.S., White, R., and Parker, M.G. (1992b). Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 4037-4041.
33. Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993a). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J.Cell Sci.* 106 (Pt 4), 1377-1388.

34. Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993b). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J.Cell Sci. 106 (Pt 4)*, 1377-1388.
35. Devin-Leclerc, J., Meng, X., Delahaye, F., Leclerc, P., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1998a). Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Mol.Endocrinol. 12*, 842-854.
36. Devin-Leclerc, J., Meng, X., Delahaye, F., Leclerc, P., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1998b). Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Mol.Endocrinol. 12*, 842-854.
37. Devin-Leclerc, J., Meng, X., Delahaye, F., Leclerc, P., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1998c). Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm. *Mol.Endocrinol. 12*, 842-854.

38. Eckert, R.L., Mullick, A., Rorke, E.A., and Katzenellenbogen, B.S. (1984). Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique. *Endocrinology* *114*, 629-637.
39. El Khissiin, A., Journe, F., Laios, I., Seo, H.S., and Leclercq, G. (2000). Evidence of an estrogen receptor form devoid of estrogen binding ability in MCF-7 cells. *Steroids* *65*, 903-913.
40. El Khissiin, A. and Leclercq, G. (1999). Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett.* *448*, 160-166.
41. El Khissiin, A. and Leclercq, G. (1999a). Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett.* *448*, 160-166.
42. El Khissiin, A. and Leclercq, G. (1999b). Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett.* *448*, 160-166.
43. El Tanani, M.K. and Green, C.D. (1997). Interaction between estradiol and growth factors in the regulation of specific gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* *60*, 269-276.
44. El Tanani, M.K. and Green, C.D. (1997). Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol.Endocrinol.* *11*, 928-937.

45. Eng, F.C., Barsalou, A., Akutsu, N., Mercier, I., Zechel, C., Mader, S., and White, J.H. (1998a). Different classes of coactivators recognize distinct but overlapping binding sites on the estrogen receptor ligand binding domain. *J.Biol.Chem.* 273, 28371-28377.
46. Eng, F.C., Barsalou, A., Akutsu, N., Mercier, I., Zechel, C., Mader, S., and White, J.H. (1998b). Different classes of coactivators recognize distinct but overlapping binding sites on the estrogen receptor ligand binding domain. *J.Biol.Chem.* 273, 28371-28377.
47. Enger, S.M., Ross, R.K., Paganini-Hill, A., Carpenter, C.L., and Bernstein, L. (2000). Body size, physical activity, and breast cancer hormone receptor status: results from two case-control studies. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9, 681-687.
48. Fontana, A. and Delmas, P.D. (1999). [Bone and hormones. Estrogens and antiestrogens: action on osteoporosis]. *Presse Med.* 28, 555-558.
49. Fuhrmann, U., Parczyk, K., Klotzbucher, M., Klocker, H., and Cato, A.C. (1998). Recent developments in molecular action of antihormones. *J.Mol.Med.* 76, 512-524.
50. Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., Miki, Y.,

- and . (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 266, 120-122.
51. Germain, D., Russell, A., Thompson, A., and Hendley, J. (2000). Ubiquitination of free cyclin D1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J.Biol.Chem.* 275, 12074-12079.
52. Gibson, M.K., Nemmers, L.A., Beckman, W.C., Jr., Davis, V.L., Curtis, S.W., and Korach, K.S. (1991). The mechanism of ICI 164,384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue. *Endocrinology* 129, 2000-2010.
53. Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. Nuclear Receptor Coactivator. *current opinion in cell biology* 9, 222-232. 1997. (GENERIC)  
Ref Type: Generic
54. Gottardis, M.M., Ricchio, M.E., Satyaswaroop, P.G., and Jordan, V.C. (1990). Effect of steroidal and nonsteroidal antiestrogens on the growth of a tamoxifen-stimulated human endometrial carcinoma (EnCa101) in athymic mice. *Cancer Res.* 50, 3189-3192.
55. Green, S., Kumar, V., Krust, A., Walter, P., and Chambon, P. (1986). Structural and functional domains of the estrogen receptor. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 2, 751-758.

56. Grese, T.A., Sluka, J.P., Bryant, H.U., Cullinan, G.J., Glasebrook, A.L., Jones, C.D., Matsumoto, K., Palkowitz, A.D., Sato, M., Termine, J.D., Winter, M.A., Yang, N.N., and Dodge, J.A. (1997). Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 14105-14110.
57. Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
58. Hershko, A. (1988). Ubiquitin-mediated protein degradation. *J.Biol.Chem.* 263, 15237-15240.
59. Iwase, H., Omoto, Y., Iwata, H., Hara, Y., Ando, Y., and Kobayashi, S. (1998). Genetic and epigenetic alterations of the estrogen receptor gene and hormone independence in human breast cancer. *Oncology* 55 *Suppl* 1, 11-16.
60. Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.
61. Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Catelli, M.G., Binart, N., Mester, J., and Baulieu, E.E. (1984). Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 308, 850-853.

62. Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J.Cell Biol.* 143, 1883-1898.
63. Jordan, V.C. (1983). Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogens: problems and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Res.Treat.* 3 *Suppl*, S73-S86
64. Jordan, V.C., Gottardis, M.M., and Satyaswaroop, P.G. (1991). Tamoxifen-stimulated growth of human endometrial carcinoma. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 622, 439-446.
65. Jordan, V.C., Naylor, K.E., Dix, C.J., and Prestwich, G. (1980). Anti-oestrogen action in experimental breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 71, 30-44.
66. Kang, K.I., Devin, J., Cadepond, F., Jibard, N., Guiochon-Mantel, A., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1994). In vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 340-344.
67. Kangas, L. (1992). Agonistic and antagonistic effects of antiestrogens in different target organs. *Acta Oncol.* 31, 143-146.

68. Kato, S. (1998). [Transcriptional control by steroid receptor]. *Nippon Rinsho* 56, 1699-1704.
69. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., and . (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.
70. Katzenellenbogen, B.S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T.R., Martini, P.G., Montano, M., Sun, J., Weis, K., and Katzenellenbogen, J.A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 74, 279-285.
71. Katzenellenbogen, B.S. and Korach, K.S. (1997). A new actor in the estrogen receptor drama--enter ER-beta. *Endocrinology* 138, 861-862.
72. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J.Biol.Chem.* 275, 15645-15651.
73. Kopf, E., Plassat, J.L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors

- alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* 275, 33280-33288.
74. Kornitzer, D. and Ciechanover, A. (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J.Cell Physiol* 182, 1-11.
75. Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1998). Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279, 703-707.
76. Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5925-5930.
77. Kuiper, G.G. and Gustafsson, J.A. (1997). The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410, 87-90.
78. Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
79. Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 74, 311-317.

80. Laherty, C.D., Billin, A.N., Lavinsky, R.M., Yochum, G.S., Bush, A.C., Sun, J.M., Mullen, T.M., Davie, J.R., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR- mediated repression by specific transcription factors. *Mol.Cell* 2, 33-42.
81. Lam, R.Y. and Chlebowski, R.T. (2000). Tamoxifen for treatment of premenopausal women with breast cancer. *Cancer Invest* 18, 681-684.
82. Lange, C.A., Shen, T., and Horwitz, K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 1032-1037.
83. Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Rose, D.W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 2920-2925.
84. Le Goff, P., Montano, M.M., Schodin, D.J., and Katzenellenbogen, B.S. (1994a). Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J.Biol.Chem.* 269, 4458-4466.

85. Le Goff, P., Montano, M.M., Schodin, D.J., and Katzenellenbogen, B.S. (1994b). Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J.Biol.Chem.* 269, 4458-4466.
86. Lee, C.S., deFazio, A., Ormandy, C.J., and Sutherland, R.L. (1996). Inverse regulation of oestrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells treated with phorbol ester. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 58, 267-275.
87. Legros, N., Jin, L., and Leclercq, G. (1997). Tamoxifen-induced estrogen receptor up-regulation in mammary tumor cells is not related to growth inhibition. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 39, 380-382.
88. Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 8479-8484.
89. Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000a). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol.Cell* 5, 939-948.
90. Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000b). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator

- turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol.Cell* 5, 939-948.
91. Lonard, D.M., Nawaz, Z., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2000c). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol.Cell* 5, 939-948.
  92. Loser, R., Seibel, K., and Eppenberger, U. (1985). No loss of estrogenic or anti-estrogenic activity after demethylation of droloxifene (3-OH-tamoxifen). *Int.J.Cancer* 36, 701-703.
  93. Lucibello, F.C., Slater, E.P., Jooss, K.U., Beato, M., and Muller, R. (1990). Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. *EMBO J.* 9, 2827-2834.
  94. MacGregor, J.I. and Jordan, V.C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol.Rev.* 50, 151-196.
  95. Mader, S., Chambon, P., and White, J.H. (1993). Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 21, 1125-1132.
  96. Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H., and 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, 271-274.
97. Mak, H.Y., Hoare, S., Henttu, P.M., and Parker, M.G. (1999). Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Mol.Cell Biol.* 19, 3895-3903.
98. Masuyama, H. and MacDonald, P.N. (1998). Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J.Cell Biochem.* 71, 429-440.
99. Mayer, R.J., Lowe, J., Lennox, G., Landon, M., MacLennan, K., and Doherty, F.J. (1989). Intermediate filament-ubiquitin diseases: implications for cell sanitization. *Biochem.Soc.Symp.* 55, 193-201.
100. McInerney, E.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation. *J.Biol.Chem.* 271, 24172-24178.
101. McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* 12, 3357-3368.

102. Meng, X., Devin, J., Sullivan, W.P., Toft, D., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1996). Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localization: dimer disruption does not impede "in vivo" interaction with estrogen receptor. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 7), 1677-1687.
103. Metzger, D., Berry, M., Ali, S., and Chambon, P. (1995). Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol.Endocrinol.* 9, 579-591.
104. Metzger, D., Clifford, J., Chiba, H., and Chambon, P. (1995). Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 6991-6995.
105. Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., and . (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.
106. Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol.Endocrinol.* 9, 814-825.
107. Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in

the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol.Endocrinol.* 9, 814-825.

108. Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1858-1862.
109. Nirmala, P.B. and Thampan, R.V. (1995). Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 213, 24-31.
110. Ogata, E. (1998). Estrogen-dependent tumors. Overview. *Oncology* 55 *Suppl* 1, 3-4.
111. Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12887-12892.
112. Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (2000). From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 14737-14741.

113. Ogawa, S., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1996). Aggressive behaviors of transgenic estrogen-receptor knockout male mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 794, 384-385.
114. Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995a). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
115. Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995b). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
116. Paranjape, S.M., Kamakaka, R.T., and Kadonaga, J.T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 265-297.
117. Parker, M.G. (1993). Steroid and related receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5, 499-504.
118. Parker, M.G. (1995). Structure and function of estrogen receptors. *Vitam.Horm.* 51, 267-287.
119. Parker, M.G., Arbuckle, N., Dauvois, S., Danielian, P., and White, R. (1993). Structure and function of the estrogen receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 684, 119-126.

120. Pazin, M.J., Bhargava, P., Geiduschek, E.P., and Kadonaga, J.T. (1997). Nucleosome mobility and the maintenance of nucleosome positioning. *Science* 276, 809-812.
121. Pazin, M.J. and Kadonaga, J.T. (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 89, 325-328.
122. Picard, D., Kumar, V., Chambon, P., and Yamamoto, K.R. (1990). Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul.* 1, 291-299.
123. Pike, A.C., Brzozowski, A.M., and Hubbard, R.E. (2000). A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 74, 261-268.
124. Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J.* 18, 4608-4618.
125. Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., Bonn, T., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (2000). Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem.Soc.Trans.* 28, 396-400.

126. Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Walton, J., Hubbard, R.E., Thorsell, A., Li, Y., Gustafsson, J., and Carlquist, M. (2001). Structural Insights into the Mode of Action of a Pure Antiestrogen. *Structure*. *9*, 145-153.
127. Pink, J.J. and Jordan, V.C. (1996). Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Res*. *56*, 2321-2330.
128. Piva, R., Kumar, L.V., Hanau, S., Maestri, I., Rimondi, A.P., Pansini, S.F., Mollica, G., Chambon, P., and del Senno, L. (1989). The methylation pattern in the 5' end of the human estrogen receptor gene is tissue specific and related to the degree of gene expression. *Biochem.Int.* *19*, 267-275.
129. Reese, J.C. and Katzenellenbogen, B.S. (1992). Examination of the DNA-binding ability of estrogen receptor in whole cells: implications for hormone-independent transactivation and the actions of antiestrogens. *Mol.Cell Biol.* *12*, 4531-4538.
130. Renaud, J.P. and Moras, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol.Life Sci.* *57*, 1748-1769.
131. Rhodes, D.E. (1969). Notes on GW 272 and 273. *Gutenberg.Jahrb.* 95-97.
132. Rodriguez, M.S., Wright, J., Thompson, J., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J.L., Hay, R.T., and Arenzana-Seisdedos, F. (1996). Identification of

lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I kappa B-alpha in vivo. *Oncogene* 12, 2425-2435.

133. Rouayrenc, J.F., Vignon, F., Bringer, J., and Pujol, P. (2000). [Non-genomic steroid effects: estrogen action revisited]. *Ann.Endocrinol.(Paris)* 61, 517-523.
134. Ruh, M.F. and Toft, D.O. (1984). Characterization of an unusual sex steroid binding component from the chicken oviduct. *J.Steroid Biochem.* 21, 1-8.
135. Saarto, T., Blomqvist, C., Ehnholm, C., Taskinen, M.R., and Elomaa, I. (1996). Antiatherogenic effects of adjuvant antiestrogens: a randomized trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer. *J.Clin.Oncol.* 14, 429-433.
136. Sadvovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J.D., Fitzpatrick, P.M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M.G., and Kushner, P.J. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 15, 1554-1563.
137. Safe, S.H. (2000). Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environ.Health Perspect.* 108, 487-493.

138. Salvat, C., Acquaviva, C., Scheffner, M., Robbins, I., Piechaczyk, M., and Jariel-Encontre, I. (2000). Molecular characterization of the thermosensitive E1 ubiquitin-activating enzyme cell mutant A31N-ts20. Requirements upon different levels of E1 for the ubiquitination/degradation of the various protein substrates in vivo. *Eur.J.Biochem.* 267, 3712-3722.
139. Saunders, P.T. (1998). Oestrogen receptor beta (ER beta). *Rev.Reprod.* 3, 164-171.
140. Scheffner, M., Nuber, U., and Huibregtse, J.M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373, 81-83.
141. Seo, H.S., Larsimont, D., Querton, G., El Khissiin, A., Laios, I., Legros, N., and Leclercq, G. (1998). Estrogenic and anti-estrogenic regulation of estrogen receptor in MCF-7 breast-cancer cells: comparison of immunocytochemical data with biochemical measurements. *Int.J.Cancer* 78, 760-765.
142. Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.

143. Stewart, P.J. and Stern, P.H. (1986). Effects of the antiestrogens tamoxifen and clomiphene on bone resorption in vitro. *Endocrinology* 118, 125-131.
144. Toniolo, P.G., Levitz, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Banerjee, S., Koenig, K.L., Shore, R.E., Strax, P., and Pasternack, B.S. (1995). A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J.Natl.Cancer Inst.* 87, 190-197.
145. Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function. *Nature* 387, 677-684.
146. Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 451-486.
147. Valavaara, R. and Kangas, L. (1988). The significance of estrogen receptors in tamoxifen and toremifene therapy. *Ann.Clin.Res.* 20, 380-388.
148. van den Bemd, G.J., Kuiper, G.G., Pols, H.A., and van Leeuwen, J.P. (1999). Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 261, 1-5.

149. Van, d., V, Nique, F., Planchon, P., Prevost, G., Bremaud, J., Hameau, M.C., Magnien, V., Philibert, D., and Teutsch, G. (1996). RU 58668: further in vitro and in vivo pharmacological data related to its antitumoral activity. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 59, 449-457.
150. Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.
151. Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu.Rev.Biochem.* 68, 1015-1068.
152. von der, A.D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schutz, G., and Beato, M. (1985). Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* 313, 706-709.
153. Wakeling, A.E. (1992). Steroid antagonists as nuclear receptor blockers. *Cancer Surv.* 14, 71-85.
154. Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., and . (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 7889-7893.

155. Wang, L., Andersson, S., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001). Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2792-2796.
156. Watabe, H., Abe, H., Ogata, T., Kumaoka, S., and Sakauchi, N. (1969). [Endocrine therapy and chemotherapy of breast cancer]. *Shujutsu*. 23, 998-1005.
157. Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., and Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol.Endocrinol.* 9, 443-456.
158. Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Stallcup, M.R., and Kushner, P.J. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol.Endocrinol.* 12, 1605-1618.
159. Weis, K.E., Ekena, K., Thomas, J.A., Lazennec, G., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol.Endocrinol.* 10, 1388-1398.

160. Wijayaratne, A.L. and McDonnell, D.P. (2001). The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J.Biol.Chem.* 276, 35684-35692.
161. Zeleniuch-Jacquotte, A., Toniolo, P., Levitz, M., Shore, R.E., Koenig, K.L., Banerjee, S., Strax, P., and Pasternack, B.S. (1995). Endogenous estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 4, 857-860.

## Aspartate 351 of Estrogen Receptor $\alpha$ Is Not Crucial for the Antagonist Activity of Antiestrogens\*

Received for publication, March 13, 2000  
Published, JBC Papers in Press, April 27, 2000, DOI 10.1074/jbc.M002098200

Silvia I. Anghel‡, Véronique Perly‡, Geneviève Melançon‡, Annie Barsalou‡, Samuel Chagnon‡, Angelika Rosenauer§, Wilson H. Miller, Jr. §¶, and Sylvie Mader‡¶||

From the ‡Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada, §Lady Davis Institute and Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital, and ¶McGill Center for Translational Research in Cancer, Montréal, Québec H3T 1E2, Canada

The antagonist activity of antiestrogens is due to the presence of a long carbon side chain at positions 7 $\alpha$  or 11 $\beta$  or equivalent on their steroid or steroid-like skeletons. These side chains establish hydrophobic interactions with amino acids of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) ligand binding domain. In addition, a hydrogen bond formed between amino acid Asp-351 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 Asp-351 in antiestrogen action in transiently transfected HeLa and MDA-MB-231 cells. 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 Asp-351 in stabilizing the active conformation of ER $\alpha$ . This stabilizing role of Asp-351 could be due to interaction of Asp-351 with the amide group of the peptide bond between Leu-539 and Leu-540 in helix 12 observed in the active conformation of the ER $\alpha$  ligand binding domain.

Estrogen regulates target gene expression by binding to specific nuclear receptors that function as ligand-dependent transcription factors. Estrogen receptors (ERs)<sup>1</sup> 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).

\* This work was supported by Grant MT-13147 from the Medical Research Council of Canada (to S. M.), a grant from the Canadian Breast Cancer Research Initiative (to W. M.), and a grant from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (to S. M. and W. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Dept. of Biochemistry, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre Ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. Tel.: 514-343-6111 (ext. 5173); Fax: 514-343-2210; E-mail: sylvie.mader@umontreal.ca.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: ER, estrogen receptor; ER $\alpha$ , estrogen receptor  $\alpha$ ; LBD, ligand-binding domain; OHT, 4-hydroxytamoxifen; Tam, tamoxifen; Ral, raloxifene; GST, glutathione S-transferase; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CMV, cytomegalovirus; ERE, estrogen response element.

For instance, the p160 family of coactivators, which in humans 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 despite modest sequence homology (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 (9, 25–27) found in the p160 family members and also in other coactivators. However, the crystal structure of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) revealed that helix 12 is repositioned in the presence of the 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 helix 12. 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 Asp-351 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 transforming growth factor- $\alpha$  in MDA-MB-231 cells stably transfected with this mutant of ER $\alpha$ , 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 $\alpha$  transactivation properties in the presence of estrogen and of antiestrogens. Our results demonstrate that Asp-351 can be mutagenized to Gly, Ala, or Val without diminishing the antagonist activity of antiestrogens in HeLa cells. However, we provide evidence for a stabilizing effect of Asp-351 on the active conformation of the wild-type ER LBD in the absence of hormones.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials**—Cell culture media and fetal bovine serum were purchased from Life Technologies, Inc. Estradiol, 4-hydroxytamoxifen (OHT), and ICI182,780 were purchased from Sigma. RU39,411 and RU58,668 were kind gifts from P. Van de Velde (Hoechst-Marion-Roussel).

**Expression Vectors and Mutagenesis of the Estrogen Receptor**—Mutations were introduced in the ER cDNA by site-directed mutagenesis using polymerase chain reaction amplification (the sequence of oligo-

nucleotides used for mutagenesis is available upon request). Expression plasmids for mutant ERs were generated by subcloning of a *HindIII/BamHI* fragment of 768 base pairs into the pSG5-HEGO expression vector. Two clones generated by independent polymerase chain 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 Gln-rich region was described previously (9, 36).

**Cell Culture and Transient Transfection Experiments**—For CAT assays, HeLa cells were transiently cotransfected with pSG5 estrogen receptor expression vectors (0.5  $\mu$ g), with the ERE3-TATA-CAT reporter vector (2  $\mu$ g; Ref. 37) and with the CMV- $\beta$ -Gal internal standard construct (2  $\mu$ g) using the calcium phosphate coprecipitation technique. Precipitates were washed 24 h after transfection, and cells were incubated in the presence of hormones (as indicated) for another 24 h before harvesting. Whole cell extracts were prepared in 0.25 M Tris-HCl, pH 7.5, by three cycles of freeze-thawing and were standardized for  $\beta$ -galactosidase activity. CAT assays were performed as described previously (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 expressed in COS-7 cells by transient transfection of 15  $\mu$ g of pSG5 expression vectors containing wild-type or mutant ER $\alpha$  cDNAs using the calcium phosphate coprecipitation technique.

**Western Blotting**—Whole cell extracts from transfected COS-7 cells were analyzed by 8% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis, transfer onto nitrocellulose, and incubation with anti-ER $\alpha$  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 described previously (38). Essentially, cell extracts from transfected COS-7 cells were preincubated with poly(dI-dC) (2  $\mu$ 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% nondenaturing polyacrylamide gels in 0.5 $\times$  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-HCl, pH 8.0, 1.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 10 mM sodium molybdate, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and protease inhibitors) by three cycles of freeze-thawing. Protein content was determined by Bradford assays (Bio-Rad). For each binding reaction, 80  $\mu$ 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]estradiol, Amersham Pharmacia Biotech), with or without a 100-fold excess of cold estradiol, and high salt buffer to a final volume of 50  $\mu$ l. After incubation for 2 h at room temperature followed by 10 min on ice, 50  $\mu$ l of high salt buffer containing 2% charcoal (Aldrich, Activated Carbon Norit SA3–100 mesh) and 0.1% Dextran T-70 (Amersham Pharmacia Biotech) were added to the samples. After 15 min of incubation on ice and centrifugation, 90  $\mu$ l of supernatant were counted by scintillation counting.

**Glutathione S-Transferase (GST) Pull-down Assays**—pSG5 plasmids containing cDNAs for wild-type or mutant ERs were linearized 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. GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 cells by isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside 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-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl $_2$ , 0.3 mM dithiothreitol, 5% glycerol, 0.1% Nonidet P-40, and protease inhibitors). Beads bound to GST fusion protein or GST alone were incubated with *in vitro* translated wild-type or mutant ERs in the presence of vehicle or 1  $\mu$ M ligand at 4 °C, overnight. The beads were then washed three times with 800  $\mu$ l of GST buffer, boiled for 2 min in 2 $\times$  Laemmli buffer, and electrophoresed on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Gels were fixed with 20% methanol, 10% acetic acid for 15 min, rehydrated for 15 min, washed for 15 min in a 1 M salicylate solution, and vacuum-dried. Autoradiography was performed overnight.

Asp (D)	-CH $_2$ -COOH	Gly (G)	-H
Glu (E)	-CH $_2$ -CH $_2$ -COOH	Ala (A)	-CH $_3$
Tyr (Y)	-CH $_2$ -  -OH	Val (V)	-CH $_2$ -(CH $_3$ ) $_2$

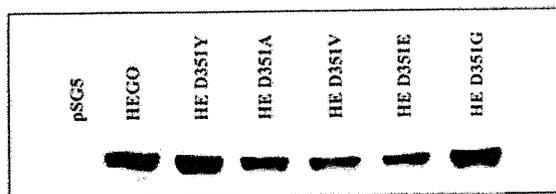


FIG. 1. Expression of ER $\alpha$  mutants at position 351. A, mutations introduced at position 351. B, expression vectors for wild-type and mutant ER $\alpha$  (15  $\mu$ g) were transiently transfected into COS-7 cells. Whole cell extracts were analyzed by Western blotting using a monoclonal antibody directed against the A/B region of human ER $\alpha$  (B10).

## RESULTS

**Mutations of ER $\alpha$  That Suppress the Negative Charge at Position 351 Have Wild-type Levels of Estradiol-induced Transcriptional Activity in HeLa cells**—Several point mutations were introduced in wild-type human ER $\alpha$  (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 $\alpha$  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). Although 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 pull-down assays using a fusion protein between GST and the coactivator TIF2.1 (9, 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 $\alpha$  (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) completely repressed transcriptional activity of HEG0 and all the Asp-351 mutants on the ERE3-TATA promoter (Fig. 4A). Weak transcriptional activity was detected in the presence of the partial antiestrogen OHT (100 nM) with HEG0 and mutants HED351E and HED351Y (Fig. 4A, inset). Activity of mutant HED351Y in the presence of OHT was comparable to those of wild-type and

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 $\alpha$ s (0.5  $\mu$ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2  $\mu$ g) and the internal control vector CMV- $\beta$ Gal (2  $\mu$ 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.

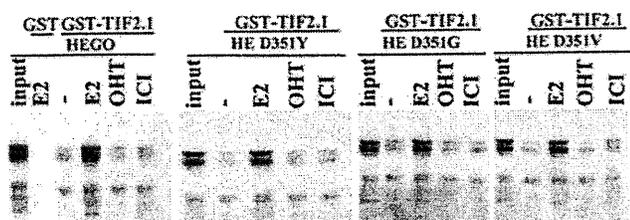
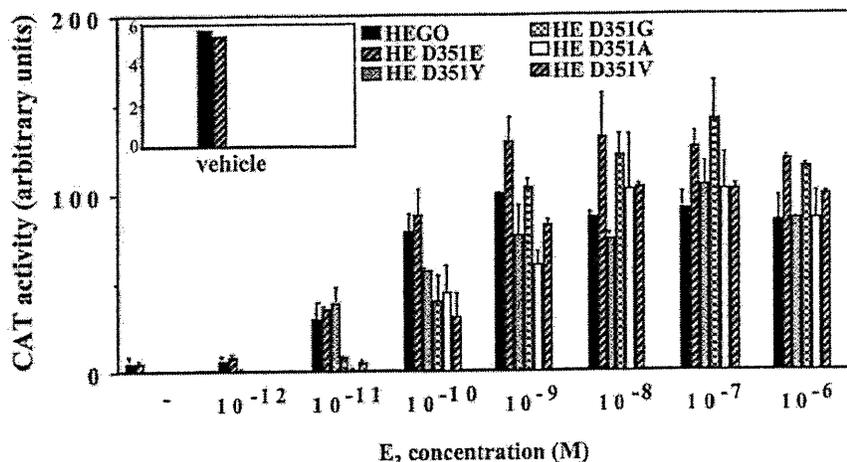


FIG. 3. Mutations that suppress the negative charge at position 351 do not affect *in vitro* recruitment of TIF2 in the presence of estradiol. GST beads bound to a fusion protein between GST and TIF2.1 or to GST alone were incubated with *in vitro* translated wild-type or mutant ERs in the presence of 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 a 10% SDS-polyacrylamide gel. 10% of input protein is shown for comparison.

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 $\alpha$  and the reporter vector ERE3-TATA-CAT. Induction of estradiol-dependent transcription was maximal when cotransfecting the expression vector pSG5-TIF2.1 (Ref. 9; data not shown). Estradiol-induced transcriptional activity of HEG0 or of the Asp-351 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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, HED351A, or HED351V 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 $\alpha$  mutants and pSG5-TIF2.1 with increasing concentrations of OHT demonstrates that, although transcrip-

tional 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 was not sufficient to increase the agonist activity of OHT in MDA-MB-231 cells.

**Suppression of the Negative Charge at Position 351 Does Not Affect Relative Binding to Estrogen and 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 E<sub>2</sub>. The resulting competition curves were similar for all receptors tested including HED351Y, suggesting that the relative affinity for OHT versus E<sub>2</sub> 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 the D351A, D351V, or D351Y mutations did not significantly affect estradiol binding (Fig. 6B and data not shown). These results demonstrate that mutations at position 351 suppressing the negative charge do not grossly perturb the structure of the ligand binding domain, and that the lower activity of the resulting mutants with OHT cannot be attributed to a low affinity for this antiestrogen.

**Suppression of the Negative Charge at Position Asp-351 Destabilizes the Active Conformation of the Ligand Binding Domain in the Absence of Hormone**—Although mutations D351G, D351A, and D351V did not affect ER $\alpha$  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 $\alpha$  ligand binding domain, G400V, which results in a receptor (HE0) with very low basal levels of activity

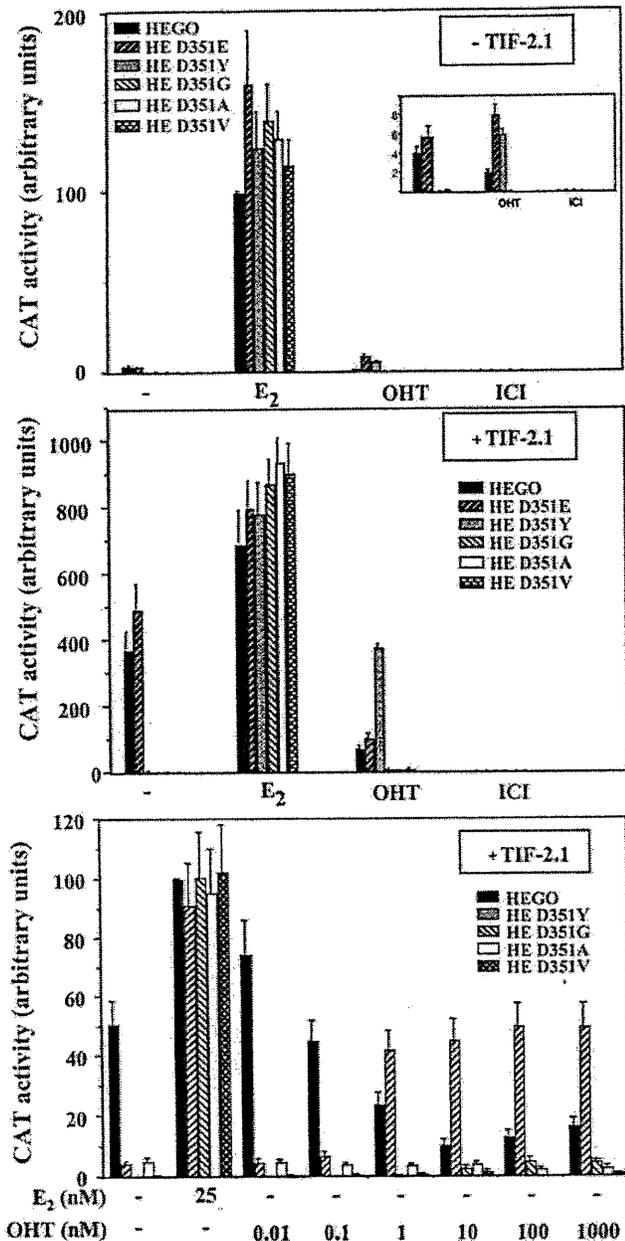


FIG. 4. TIF-2 overexpression does not increase transcriptional activity of hydrophobic mutants of Asp-351 in HeLa cells treated with OHT. Expression vector for wild-type or mutant ERs (0.5  $\mu$ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2  $\mu$ g), the internal control vector CMV- $\beta$ Gal (2  $\mu$ g) and the pSG5 vector (A) or pSG5TIF-2.1 vector (2  $\mu$ g) (B and 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).

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 $\alpha$  and all Asp 351 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 and 2; note that concentrations of the Asp 351 mutants were higher than those of HEGO in this assay). By comparison, ER mutant HEO did not bind DNA in the absence of hormone (Fig. 7, compare lanes 3 and 4 to lanes 1 and 2). These results suggest that, unlike mutation G400V, mutations at position 351 do not affect

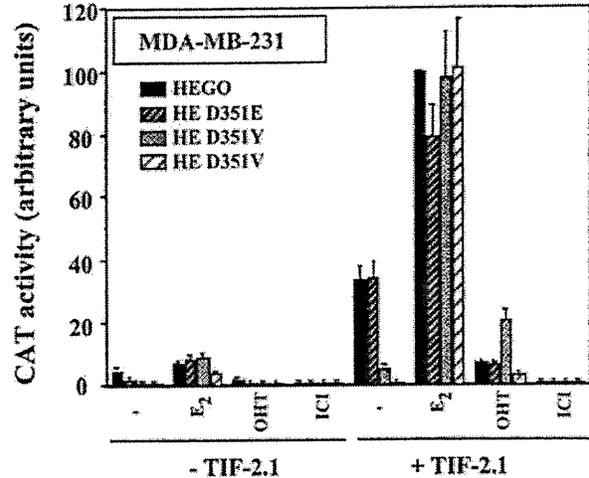


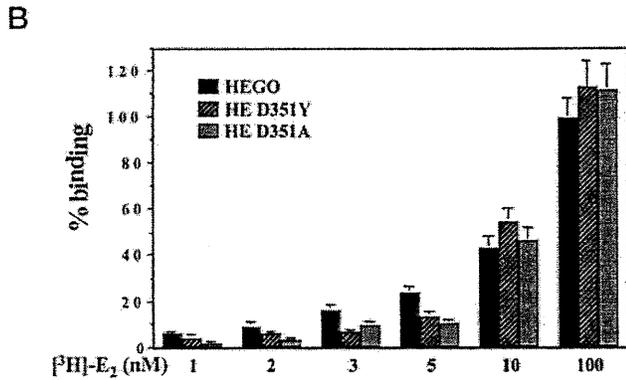
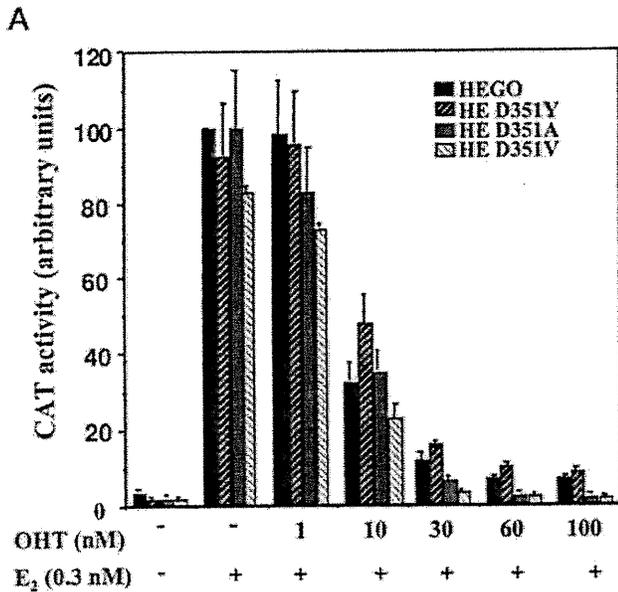
FIG. 5. Transcriptional activity of ER mutants carrying hydrophobic mutations of Asp-351 is low in MDA-MB-231 cells treated with OHT. Expression vector for wild-type or mutant ERs (0.5  $\mu$ g) were transiently transfected into MDA-MB-231 cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2  $\mu$ g), the internal control vector CMV- $\beta$ Gal (2  $\mu$ g), and pSG5 or pSG5-TIF-2.1 (2  $\mu$ g), as indicated. CAT activity was measured in extracts from cells treated with estradiol (25 nM), OHT, or ICI 182,780 (100 nM).

DNA binding and dimerization.

The absence of effect of the Asp-351 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 $\alpha$  in the absence of added estrogen. To confirm that mutations at position Asp-351 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 $\alpha$  mutants that can recruit coactivators in the absence of hormone *in vitro* (33, 34, 35). While mutants HEY537A and HEL536P activated the ERE3-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 with that of their singly mutated counterparts (Fig. 8). These results confirm that Asp-351 plays a role in the active conformation of ER $\alpha$  that is more important in the absence of hormone than in its presence.

#### DISCUSSION

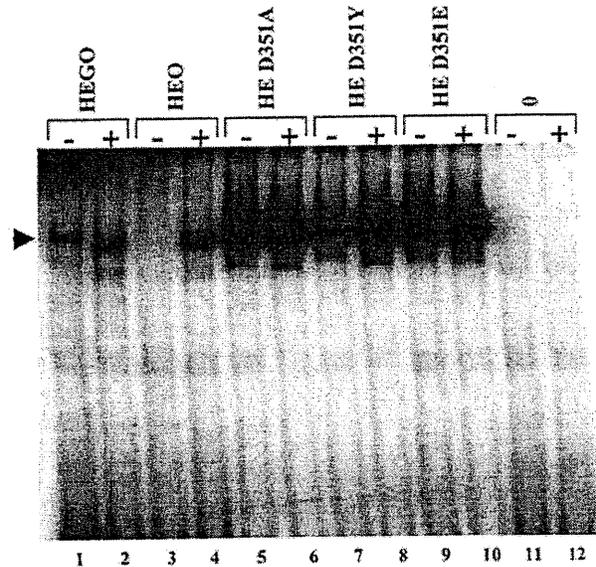
The presence and precise length of the antiestrogen side chain has been correlated with their antagonist activity (39, 40). In human ER $\alpha$ , aspartate 351 interacts with the tertiary amine present at the end of the side chains of Tam and Ral (16, 23). We have investigated the precise role of this interaction in the pharmacology of partial antiestrogens. Hydrogen bonding between Asp-351 and the side chain of partial antiestrogens could potentially contribute to the affinity of the ER $\alpha$ -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 Asp-351 by Ala or Val 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 $\alpha$  and



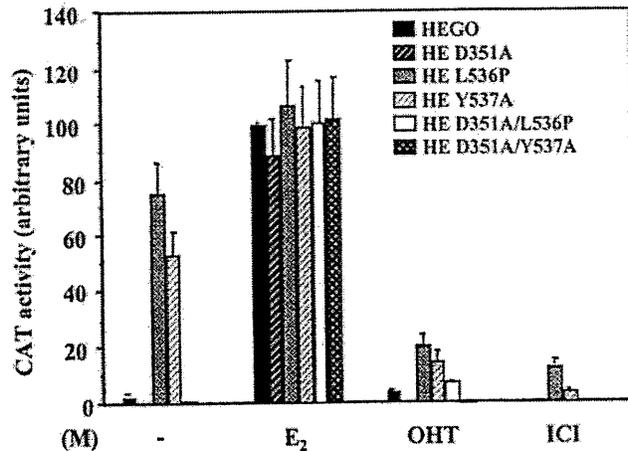
**Fig. 6. Effect of mutations of Asp-351 on estrogen and antiestrogen binding by ER $\alpha$ .** A, expression vectors for wild-type or mutant ERs at position 351 (0.5  $\mu$ g) were transiently transfected into HeLa cells along with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2  $\mu$ g) and the internal control vector CMV- $\beta$ Gal (2  $\mu$ g). CAT activity was measured in extracts from cells treated with 0.3 nM estradiol mixed with varying concentrations of OHT. B, equal amounts of total proteins from transiently transfected COS-7 cells were incubated at room temperature with varying concentrations of tritiated estradiol in the absence or the presence of 100-fold excess unlabeled hormone. Unbound hormone was removed by incubation with activated charcoal. 100% binding corresponds to binding by the wild-type ER at saturation

partial antiestrogens.

It has been suggested that amino acid Asp-351 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 Asp-351 may be to maintain the side chain of OHT or Ral in an antagonist position. Among the mutations at position 351 tested here, 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 bound to partial antiestrogens. However, our results indicate that disruption of the hydrogen bond between Asp-351 and the side chain of partial antiestrogens is not sufficient for this effect. Indeed, replacement of Asp-351 by Gly, Ala, or Val did not increase the



**Fig. 7. Effect of mutations of Asp-351 on the DNA binding properties of ER $\alpha$ .** COS-7 cells were transiently transfected with 15  $\mu$ 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 25  $^{\circ}$ C, and complexes were separated by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.



**Fig. 8. Suppression of basal activity by mutations of Asp-351 is due to destabilization of the active conformation of unliganded ER $\alpha$ .** Expression vectors for wild-type or mutant ERs (0.5  $\mu$ g) were transiently transfected into HeLa cells together with the reporter vector ERE3-TATA-CAT (2  $\mu$ g) and the internal control vector CMV-Gal (2  $\mu$ g). CAT activity was measured in extracts from cells treated with estradiol (25 nM), OHT, or ICI 182,780 (100 nM).

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 has 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 Asp-351 of ER $\alpha$ , but also with the glucocorticoid receptor, which contains a glycine instead (19).

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 ligand 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 Asp-351 inhibits folding of the unliganded receptor in an active conformation, while estradiol binding was sufficient to stabilize the active conformation despite the D351A mutation. Examination of the active structure of the ER $\alpha$  ligand binding domain reveals that Asp-351 interacts with the amide of the peptide bond between helix 12 amino acids Leu-539 and Leu-540 (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 Asp-351 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 Asp-351 may be less important in the liganded receptor. The larger stimulation of wild-type ER $\alpha$  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 $\alpha$  LBD. Hydrophobic mutations of Asp-351 fully blocked this positive effect of TIF2.1 on basal activity of ER $\alpha$ , supporting our hypothesis that Asp-351 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 Asp-351 and the antiestrogen side chain can be disrupted without affecting antagonist activity are unexpected. However, we cannot exclude possible tissue-specific effects or the possibility that interaction of the antiestrogen side chain with Asp-351 may prevent this amino acid from stabilizing an active conformation of the ER in a manner similar to our observations with the unliganded receptor. Mutagenizing Asp-351 to hydrophobic residues would prevent such a stabilizing role in addition to disrupting the hydrogen bond with the antiestrogen side chain.

In conclusion, our data demonstrate that ER $\alpha$  mutants lacking the negative charge at amino acid Asp-351 are efficiently repressed by partial antiestrogens in HeLa cells. These results are not consistent with a crucial role of amino acid Asp-351 in maintaining the side chain of OHT in an antagonist conformation.

**Acknowledgments**—We 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

- Green, S., and Chambon, P. (1988) *Trends Genetics* 4, 309–314
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989) *Cell* 59, 477–487
- Lees, A. J., Fawell, S. E., and Parker, M. G. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 5477–5488
- Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G. (1995) *Cell* 83, 851–857
- Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richer, J. K., Takimoto, G. S., and Tung, L. (1996) *Mol. Endocrinol.* 10, 1167–1177
- Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (1997) *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 222–232
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995) *Science* 270, 1354–1357
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokaawa, R., Gloss, B., Liin, S.-C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C., Rosenfeld, M. G. (1996) *Cell* 85, 403–414
- Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996) *EMBO J.* 15, 3667–3675
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L., and Stallcup, M. R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4948–4952
- Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X.-Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.-P., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1997) *Science* 277, 965–968
- 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* 90, 569–580
- Li, H., Gomes, P. J., and Chen, J. D. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8479–8484
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* 375, 377–382
- Renaud, J.-P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995) *Nature* 378, 681–689
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (1997) *Nature* 389, 753–758
- 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
- Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeborg, L., and Berkenstam, A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 31108–31112
- Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998) *Nature* 393, 392–396
- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996) *Nat. Struct. Biol.* 3, 87–94
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J., and Yamamoto, K. R. (1998) *Genes Dev.* 12, 3343–3356
- Feng, W., Ribeiro, R. C. J., Wagner, R. L., Nguyen, H., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J., and West, B. L. (1998) *Science* 280, 1747–1749
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P., Agard, P. J., and Greene, G. L. (1998) *Cell* 95, 927–937
- Mak, H. Y., Hoare, S., Henttu, P. M. A., and Parker, M. G. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19, 3895–3903
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) *Nature* 387, 733–736
- 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
- 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, 3357–3368
- Levenson, A. S., and Jordan, V. C. (1997) *Cancer Res.* 58, 1872–1875
- Wolf, D. M., and Jordan, V. C. (1994) *Breast Cancer Res. Treat.* 31, 129–138
- Wolf, D. M., and Jordan, V. C. (1994) *Breast Cancer Res. Treat.* 31, 117–127
- Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., and Chambon, P. (1989) *EMBO J.* 8, 1981–1986
- Eng, F. C. S., Lee, H. S., Ferrara, J., Willson, T. M., and White, J. H. (1997) *Mol. Cell Biol.* 17, 4644–4653
- Eng, F. C. S., Barsalou, A., Akutsu, N., Mercier, I., Zechel, C., Mader, S., and White J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 28371–28377
- White, R., Sjöberg, M., Kalkhoven, E., and Parker, M. G. (1997) *EMBO J.* 16, 1427–1435
- Lazennec, G., Ediger, T. R., Petz, L. N., Nardulli, A. M., and Katzenellenbogen, B. S. (1997) *Mol. Endocrinol.* 11, 1375–1386
- Voegel, J. J., Heine, M. J. S., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998) *EMBO J.* 17, 507–519
- Barsalou, A., Gao, W., Anghel, S. I., Carriere, J., and Mader, S. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 17138–17146
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., and Chambon, P. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 591–600
- Jordan, V. C., and Gosden, B. (1982) *Mol. Cell. Endocrine* 27, 291–306
- Lednicer, D., Lyster, S. C., and Duncan, G. W. (1967) *J. Med. Chem.* 10, 78–86
- Catherino, W. H., Wolf, D. M., and Jordan, V. C. (1997) *Mol. Endocrinol.* 9, 1053–1063
- Robertson, D. W., Katzenellenbogen, J. A., Hayes, J. R., and Katzenellenbogen, B. S. (1982) *J. Med. Chem.* 25, 167–171