

Université de Montréal

Rôle de la synthèse de l'acide rétinoïque dans le contrôle de la  
prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales mammaires

par

Maxime Parisotto

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)  
en biochimie

Août 2010

© Maxime Parisotto 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle de la synthèse de l'acide rétinoïque dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales mammaires

présentée par :

Maxime Parisotto

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Gerardo Ferbeyre : Président rapporteur

Sylvie Mader : Directrice de recherche

Pangala V. Bhat : Codirecteur

Julie Lessard : Membre du jury

Norbert Ghyselinck : Examineur externe

Edward Bradley : Représentant du doyen de la FES

## Sommaire

L'acide rétinoïque (AR) est le ligand des récepteurs nucléaires RAR et RXR qui agissent comme facteurs de transcription ligand-inductibles et médient ses effets biologiques. Il est connu que l'AR a des propriétés prodifférenciatrices et antiprolifératives, notamment sur les cellules de l'épithélium mammaire. Une perte de sensibilité de l'AR a toutefois été mise en évidence dans plusieurs lignées cellulaires mammaires cancéreuses, ce qui pourrait faciliter la croissance des tumeurs. Or jusqu'ici cette perte de sensibilité avait été attribuée à des défauts de la voie de signalisation de l'AR, causée par la perte de l'expression des récepteurs à l'AR dans la tumeur, bien que plusieurs lignées de cellules cancéreuses y soient tout de même très sensibles.

Peu d'études se sont intéressées au rôle de la voie de synthèse de l'AR dans la transformation des cellules mammaires. En effet, l'AR est synthétisé à partir de la vitamine A, ou rétinol, son précurseur sanguin provenant de la diète. Les cellules de l'épithélium mammaire normales ont la capacité de synthétiser l'AR à partir du rétinol. Nos rapports nous ont permis pour la première fois que l'épithélium mammaire est probablement le siège de la synthèse et de la signalisation de l'AR. Cela est dû, au moins en partie, à l'expression d'une enzyme de synthèse de l'AR, RALDH3, dans l'épithélium mammaire normal. Dans cette étude, nous démontrons que les cellules cancéreuses de type luminal, qui sont sensibles à l'AR (et qui expriment le récepteur des estrogènes ER $\alpha$ , catégorie qui regroupe 75 % des tumeurs diagnostiquées) n'ont au contraire pas la capacité de synthétiser l'AR, probablement en raison d'une faible expression de RALDH3 dans les tumeurs, sous l'effet des estrogènes. Cela pourrait représenter un nouveau mécanisme favorisant la croissance des tumeurs lumineales dont les cellules prolifèrent en présence du rétinol sanguin. RALDH1, une autre enzyme de la voie de synthèse de l'AR, et qui partage 70 % d'identité de séquence avec RALDH3, est un marqueur de tumeurs plus agressives et de la formation de

métastase. Nous montrons au contraire, que RALDH3 est un marqueur d'une moindre probabilité de développer des métastases chez les patientes atteintes d'une tumeur luminale. Cela suggère des rôles différents pour ces deux enzymes dans la glande mammaire. Nos résultats indiquent que RALDH1 et 3 ont des propriétés enzymatiques très différentes, ce qui est en accord avec cette dernière hypothèse. Nos données suggèrent aussi que RALDH1 et 3 pourraient être des marqueurs de populations distinctes de cellules dans la glande mammaire normale. Nous proposons d'exploiter les différences entre RALDH1 et 3 afin de mettre au point des méthodes de séparation des différentes populations de cellules de l'épithélium mammaire ce qui pourrait aider à comprendre le rôle de la synthèse d'AR dans ce tissu.

Mots clés : acide rétinoïque, RALDH, cancer du sein, cellule souche

## Summary

Retinoic acid (RA) is ligand of nuclear receptors RARs and RXRs that act as ligand-inducible transcription factors and mediate its biological effects. It was shown that RA has antiproliferative and prodifferentiating properties in mammary cells. A loss of RA sensitivity was associated with increased tumorigenicity in the mammary tissue, potentially facilitating the growth of tumors. It's believed that is was mainly due to deficiencies in the RA signaling pathway, probably caused by the loss of RAR and RXR expressions. However, some tumorigenic cell lines were still reported to be RA sensitive.

The role of RA synthesis in mammary tumorigenesis has been poorly characterized. RA is synthesized in target tissues from vitamin A (retinol) its precursor in blood. It was shown that mammary epithelial cells were able to synthesize RA from retinol *in vitro*. We show here for the first time that RALDH3, an enzyme involved in RA synthesis, is probably responsible for RA synthesis in normal mammary epithelial cells. Our result suggest that luminal cancer cells (that express ER $\alpha$  and represent 75 % of breast tumors) have a very low capacity of RA synthesis, probably due to a low estrogen-mediated RALDH3 expression. It might represent a new mechanism of estrogen-driven tumorigenesis allowing RA sensitive tumors to proliferate in the presence of retinol in the blood. It was suggested that RALDH1, an other enzyme of the RA synthesis pathway that shares 70 % of identity with RALDH3, is a marker of mammary stem cells, of more aggressive tumors and higher occurrence of metastasis. We shown that unlike RALDH1, RALDH3 is a marker of a lower occurrence of metastasis and probably a marker of differentiation, suggesting different roles in the mammary gland for these 2 enzymes. This is in good agreement with our results showing that they have very different enzymatic properties. All together our data suggest that RALDH1 and 3 might be markers of different populations of cells of in the mammary epithelium. We propose to use the differences between RALDH1 and 3 to rationally develop methods and tools to

separate and isolate RALDH1- and 3-expressing cells that would help the understand the role of RA synthesis in the mammary gland

Keywords: retinoid acid, RALDH, breast cancer, stem cell

## Table des matières

<b>Sommaire .....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary .....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>vii</b>
<b>Listes des figures.....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des sigles et des abréviations .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Bref historique de la découverte de l'acide rétinoïque .....</b>	<b>2</b>
1.1 La vitamine A .....	2
1.2 Rôle physiologique de la vitamine A .....	3
1.3 Les rétinoïdes dans la diète .....	5
1.3.1 Les sources végétales de vitamine A.....	5
1.3.2 Les sources animales de vitamine A .....	6
1.4 L'AR est la forme biologiquement active principale de la vitamine A.....	6
1.5 L'AR affecte la synthèse des protéines .....	7
<b>2. Le mode d'action de l'AR.....</b>	<b>8</b>
2.1 Concept de récepteur nucléaire .....	8
2.2 Les récepteurs nucléaires de l'AR.....	9
2.2.1 Les RAR.....	9
2.2.2 Les RXR.....	11
2.2.3 Structure des récepteurs RAR et RXR .....	11
2.3 Signalisation par l'AR.....	13
2.3.1 Les éléments de réponse à l'AR.....	13
2.3.2 La répression transcriptionnelle en absence d'AR.....	14
2.3.3 Activation de la transcription par l'AR .....	16

2.3.4	Modulation de l'activité transcriptionnelle de l'AR par modifications post-traductionnelles. ....	17
2.3.5	L'isomère 9- <i>cis</i> de l'AR.....	18
2.4	Études génétiques de la signalisation de l'AR .....	20
<b>3.</b>	<b>Métabolisme de l'AR dans les cellules cibles .....</b>	<b>23</b>
3.1	Les protéines de transport des rétinoïdes .....	23
3.1.1	Le rétinol dans le sang.....	23
3.1.2	Le récepteur membranaire STRA6.....	24
3.1.3	Transport des rétinoïdes dans les cellules .....	24
3.1.3.1	Les CRBP .....	25
3.1.3.2	Les CRABP .....	25
3.2	Les enzymes de synthèse de l'AR.....	28
3.2.1	Oxydation du rétinol en rétinol.....	28
3.2.1.1	Les ADH.....	28
3.2.1.2	Les SDR .....	29
3.2.2	L'oxydation du rétinol en AR.....	30
3.2.2.1	Les ALDH .....	30
3.2.2.2	Mécanisme réactionnel.....	31
3.2.2.3	Les RALDH .....	32
3.2.2.4	RALDH1 .....	33
3.2.2.4.1	RALDH1 participe à la synthèse d'AR in vivo.....	33
3.2.2.4.2	RALDH1 un marqueur de cellules souches? .....	34
3.2.2.5	RALDH2 .....	35
3.2.2.6	RALDH3 .....	36
3.2.2.7	RALDH4 .....	37
3.3	Le catabolisme de l'AR.....	37
<b>4.</b>	<b>La glande mammaire .....</b>	<b>38</b>
4.1	Description anatomique.....	38
4.1.1	Le stroma.....	38
4.1.2	L'épithélium mammaire.....	41



4.1.2.1	Le compartiment basal .....	41
4.1.2.2	Le compartiment luminal .....	42
4.2	Hiérarchie cellulaire dans l'épithélium mammaire .....	42
4.2.1	Le modèle d'organisation hiérarchique de l'épithélium mammaire .....	43
4.2.1.1	Mise en évidence et isolation des cellules souches mammaires .....	43
4.2.1.2	Potentiel de différenciation des cellules souches mammaires.....	45
4.2.1.3	Différenciation des cellules souches mammaires.....	46
4.3	Développement de la glande mammaire .....	47
4.3.1	Hormones stéroïdiennes et développement de la glande mammaire .....	48
4.3.1.1	Signalisation par les estrogènes: le récepteur nucléaire ER $\alpha$ .....	49
4.3.1.2	Les estrogènes et le développement de la glande mammaire.....	51
4.3.1.3	Mécanismes d'action des estrogènes dans l'épithélium mammaire.....	52
4.3.1.4	Le récepteur ER $\beta$ .....	53
4.3.1.5	La progestérone .....	53
4.3.2	Rôle de l'AR dans le développement de la glande mammaire.....	54
4.3.3	L'AR et les cellules en culture .....	55
4.3.3.1	Modèles de cellules cultivées en 3 dimensions .....	55
4.3.3.2	Effet de l'AR sur les cellules cultivées en trois dimensions .....	56
4.3.3.3	Cellules cultivées en monocouches.....	57
4.3.3.4	Synthèse de l'AR dans les cellules mammaires <i>in vitro</i> .....	58
4.4	Le cancer du sein.....	59
4.4.1	Origines du cancer du sein .....	59
4.4.2	Hétérogénéité des tumeurs mammaires.....	60
4.4.3	Les cellules souches cancéreuses (CSC).....	60
4.4.3.1	Émergence du concept de CSC .....	60
4.4.3.2	Les CSC dans le cancer du sein.....	61
4.4.3.3	Hétérogénéité des tumeurs mammaires.....	62
4.4.3.4	La transition épithéliale-mésenchymateuse.....	63
4.4.3.5	Classification des tumeurs mammaires .....	63
4.4.3.5.1	Les tumeurs lumineales ou ER $\alpha$ -positives.....	64
4.4.3.5.2	Les tumeurs Her-2-positives .....	65

4.4.3.5.3 Les tumeurs basales ou triples négatives.....	65
4.4.4 Les rétinoïdes et le cancer du sein.....	66
4.4.5 Les rétinoïdes dans le traitement du cancer.....	67
<b>5. Problématique.....</b>	<b>69</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>70</b>
<b>1<sup>er</sup> article: Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates .....</b>	<b>71</b>
<b>2<sup>e</sup> article : Low RALDH activity in luminal breast tumors enables proliferation of retinoic acid-sensitive cancer cells .....</b>	<b>90</b>
<b>3<sup>e</sup> article: Lack of specificity of the Aldefluor assay for ALDHs results in co- purification of different mammary epithelial cell populations .....</b>	<b>144</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>183</b>
<b>1. Rôle de la synthèse d'AR dans la glande mammaire .....</b>	<b>184</b>
1.1 La signalisation de l'AR est activée dans la glande mammaire .....	184
1.1.1 L'expression de RALDH3 corrèle avec la capacité de synthèse de l'AR dans les cellules en culture .....	184
1.1.2 RALDH3 semble être impliquée dans la synthèse d'AR dans la glande mammaire de souris.....	186
1.2 Rôle potentiel des RALDH dans le développement et la tumorigenèse mammaire: une question de sensibilité à l'AR .....	188
1.2.1 Sensibilité et capacité de synthèse de l'AR sont inversement corrélées chez les cellules cancéreuses.....	188
1.2.2 L'expression de RALDH3 est plus faible dans les tumeurs ER $\alpha$ + .....	189
1.2.3 L'action estrogènes pourrait expliquer faible expression de RALDH3 dans les tumeurs luminales.....	191
1.2.4 L'expression de RALDH3 mais pas de RALDH1 diminue la croissance des cellules cancéreuses luminales.....	193
1.3 Plusieurs RALDH avec des schémas d'expression différents dans la glande mammaire.....	195

1.3.1	Dans l'épithélium mammaire normal.....	195
1.3.2	Dans les lignées tumorales mammaires.....	196
1.3.3	Dans les tumeurs .....	197
<b>2.</b>	<b>Les RALDH : plusieurs enzymes aux fonctions spécifiques dans la glande mammaire .....</b>	<b>197</b>
2.1	Les RALDH ont des spécificités de substrats différentes .....	197
2.2	Bases moléculaires de la reconnaissance du substrat.....	198
2.2.1	Sélectivité 9- <i>cis</i> /tout- <i>trans</i> des RALDH .....	198
2.2.2	Données structurales.....	199
2.3	Les RALDH synthétisent l'AR avec des efficacités différentes .....	200
2.3.1	RALDH1 est moins efficace que RALDH3 pour catalyser la synthèse d'AR dans les cellules .....	200
2.3.2	RALDH3 est plus active que RALDH1 <i>in vitro</i> .....	201
2.3.3	Interprétations des résultats expérimentaux: limitations .....	202
<b>3.</b>	<b>Les RALDH en tant que marqueurs pronostiques dans le cancer du sein .</b>	<b>203</b>
3.1	RALDH1, marqueur de cellules souches cancéreuses et de mauvais pronostique .....	203
3.2	RALDH3, marqueur de différenciation luminale et de bon pronostique? ...	205
3.3	Comment discriminer les cellules qui expriment RALDH1 ou RALDH3? .	206
3.3.1	Le kit aldefluor® n'est pas sélectif .....	206
3.3.2	Concevoir une méthode pour discriminer les cellules qui expriment RALDH1 et RALDH3? .....	207
	<b>Conclusion.....</b>	<b>209</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>213</b>

## Listes des figures

### Introduction

Figure 1.....	3
Figure 2.....	9
Figure 3.....	13
Figure 4.....	20
Figure 5.....	27
Figure 6.....	40
Figure 7.....	48

### Article 1

Figure 1.....	84
Figure 2.....	85
Figure 3.....	86
Figure 4.....	87
Figure 5.....	88
Figure 6.....	89

### Article 2

Figure 1.....	128
Figure 2.....	129
Figure 3.....	130
Figure 4.....	131
Figure 5.....	132
Figure 6.....	133
Figure 7.....	134
Figure 8.....	135
Figure 9.....	136
Figure supplémentaire 1 .....	137
Figure supplémentaire 2 .....	138

Figure supplémentaire 3 .....	139
Figure supplémentaire 4 .....	140
Figure supplémentaire 5 .....	141
Figure supplémentaire 6 .....	142
Figure supplémentaire 7 .....	143

### **Article 3**

Figure 1.....	176
Figure 2.....	177
Figure 3.....	178
Figure 4.....	179
Figure 5.....	180
Figure 6.....	181
Figure supplémentaire .....	182

### **Discussion**

Figure 1.....	212
---------------	-----

## Liste des sigles et des abréviations

ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	fonction d'activation 1
AF-2	fonction d'activation 2
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
AR	acide rétinoïque
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénine triphosphate
BAAA	BODIPY-aminoacétaldehyde
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CRABP	<i>cellular retinoid acid binding protein</i>
CRBP	<i>cellular retinol binding protein</i>
CSC	cellule souche cancéreuse
CSH	cellule souche hématopoïétique
CSM	cellule souche mammaire
DEAB	diéthylamino-benzaldéhyde
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
ERα	récepteur de l'estrogènes alpha
ERβ	récepteur de l'estrogènes bêta
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
GR	récepteur des glucocortinoïdes
HAT	<i>histone acetyl transferase</i>
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IHC	immuno-histochimie
K <sub>D</sub>	constante de dissociation

LXR	<i>liver X receptor</i>
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCOR	<i>nuclear coreceptor</i>
PKA	protéine kinase A
PKB	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PR	<i>progesterone receptor</i>
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
RALDH	rétinal déshydrogénase
RAMBA	<i>retinoic acid metabolism blocking agent</i>
HMEC	<i>human mammary epithelial cells</i>
RAR	<i>retinoic acid receptor</i>
RARE	<i>retinoic acid response element</i>
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SMRT	<i>silencing mediator of RAR and thyroid hormone receptor</i>
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SRC	<i>steroid receptor coactivator</i>
VDR	<i>vitamin D receptor</i>

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement la Dr. Sylvie Mader de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour y effectuer cette passionnante thèse de doctorat. Au long de ces années, elle a su me transmettre son enthousiasme et sa passion de la science. J'ai pu acquérir grâce à mon passage au laboratoire les connaissances et habiletés qui m'aideront certainement à poursuivre dans la recherche. Je tiens particulièrement à remercier Sylvie pour son soutien et sa patience dans les moments plus difficiles ainsi que de m'avoir toujours poussé à aller bien au-delà de ce que je pensais être mes limites.

Je voudrais remercier le Dr. Bhat pour avoir co-dirigé ma thèse, lui aussi m'a transmis des compétences et des connaissances qui me seront très utiles à l'avenir. Je le remercie pour son soutien.

Bien entendu je voudrais adresser mes remerciements aux membres du labo, passés et présents, et particulièrement Khalid Hilmi, Nader Hussein, Martine Bail, Marieke Rozendaal, David Cotnoir-White, et tout les autres amis que je me suis fait dans ce labo. Nous avons pu garder une ambiance de travail vraiment agréable que je n'oublierai pas. Je remercie ceux qui ont travaillé avec moi sur mon projet pour l'aide, les conseils précieux (merci Martine!) et leurs bonnes idées. Je les remercie aussi de m'avoir supporté, moi et mes jokes plates.

Je voudrais remercier mes parents pour m'avoir toujours soutenu pendant ces très longues études que je n'aurais pu entreprendre sans eux, même loin de la France. Et bien sûr un gros merci à ma femme, Marilyn Carrier, nul besoin de dire pourquoi, elle le sait.

Enfin je tiens à remercier l'Université de Montréal, particulièrement la FES pour le financement, ainsi que les CIHR.

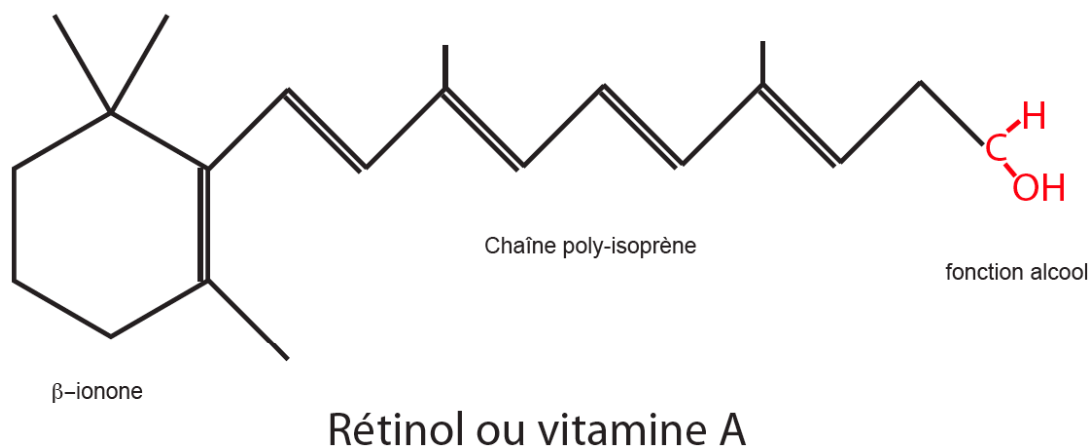


# Introduction

## 1. Bref historique de la découverte de l'acide rétinoïque

### 1.1 La vitamine A

Frederick Hopkins suggéra le premier en 1912 l'existence des vitamines (découverte pour laquelle il reçut le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1921 avec Christiaan Eijkman). F. Hopkins ainsi que plusieurs autres scientifiques contemporains remarquèrent que de jeunes rats nourris avec un substitut artificiel de lait (composé essentiellement de gras, de protéines, d'amidon ainsi que de sels minéraux) présentaient plusieurs pathologies et accusaient un retard de croissance très important par rapport aux rats nourris avec du vrai lait [1, 2]. Toutefois si une quantité de lait ou de beurre, même minuscule, était ajoutée à la diète artificielle des jeunes rats, le retard de croissance disparaissait. F. Hopkins en déduisit qu'il devait exister un « principe vital » (d'où le nom de vitamine) dans le lait, absolument nécessaire à la croissance et à la vie en bonne santé des rats. Ce composé non identifié n'était pas un acide gras, ni une protéine, ni un sucre. Cette vitamine, la première identifiée, fut nommée vitamine A. On déduisit sa nature lipidique de sa haute solubilité dans les graisses mais pas dans l'eau, elle fut d'ailleurs détectée et isolée peu de temps après sa découverte à partir de corps riches en gras comme le beurre, le jaune d'œuf et l'huile de foie de morue [2]. Pour cette raison, cette vitamine fut aussi appelée « facteur-liposoluble A » durant les premières décennies du XXe siècle. Mais ce n'est qu'en 1931 que Paul Karrer put résoudre sa structure chimique [3]. Il découvrit que la vitamine A est une molécule composée d'un noyau cyclique  $\beta$ -ionone associé à une chaîne latérale linéaire poly-isoprène insaturée terminée par une fonction alcool (Figure 1).



**Figure 1**

Structure schématique de la molécule de rétinol (vitamine A)

### 1.2 Rôle physiologique de la vitamine A

Un résultat important fut l'observation que les rats ainsi que les humains carencés en vitamine A deviennent aveugles, la vision en condition de faible luminosité étant particulièrement touchée en raison d'une perte de sensibilité à la lumière. Dans les cas de carences les plus graves, il se produit aussi une atrophie avec kératinisation de la cornée (l'épithélium oculaire) appelée xérophtalmie, ce qui cause son opacification et donc la cécité [4, 5]. Toutefois les sujets carencés auxquels de la vitamine A fut administrée purent retrouver une vue normale. Cela suggérait un rôle important de cette vitamine dans la vision, notamment dans le maintien d'une cornée fonctionnelle, non-atrophiée, ainsi que dans la sensibilité de l'œil à la lumière. En accord avec cette dernière assertion, une grande concentration de vitamine A a été trouvée dans la rétine de plusieurs espèces d'animaux [6]. Il a donc été proposé de la nommer « rétinol » en raison de sa fonction apparemment importante dans l'œil (qui restait alors encore à préciser).

Les années 1930-1940 furent une période d'intenses recherches sur les effets physiologiques du rétinol. En ce qui concerne le développement embryonnaire, de nombreuses études montrèrent les effets tératogènes d'une

carence mais aussi d'un excès en vitamine A [7-9]. Chez l'individu adulte, il fut rapidement établi que les tissus qui étaient les plus touchés par la carence étaient les divers épithéliums de l'organisme. Ce sont des tissus constitués de cellules juxtaposées, solidarisées par des systèmes de jonction serrées et séparées du tissu conjonctif par une membrane basale. Ils établissent une barrière entre deux milieux de nature différente. Ils sont présent au niveau de nombreux organes. Par exemple la peau, la cornée, l'épithélium mammaire ou la muqueuse intestinale sont des tissus épithéliaux. En plus de la xérophtalmie que nous avons déjà évoqué, les atteintes observées chez les animaux carencés incluait la métaplasie (avec kératinisation) de l'épithélium de la trachée, du larynx, de la langue, de la bouche (et du tractus digestif en général) ainsi que des glandes salivaires [10], l'atrophie et la dégénération des tubules testiculaires [11], des glandes paraoculaires et des canaux pancréatiques ainsi que de l'épithélium du tractus uro-génital [12] et du tissu épithélial de la glande mammaire [13]. Ces atteintes diverses sont liées à des défauts de différenciation des cellules épithéliales et sont réversibles par l'administration de vitamine A, mais aussi de certains de ses dérivés et en particulier de « vitamine A acide » ou acide rétinoïque (AR) [14-16].

Cela conduisit la communauté scientifique à deux conclusions majeures : la première est que la vitamine A joue un rôle biologique crucial lors du développement embryonnaire ainsi que dans la différenciation des épithéliums de l'adulte [7], la seconde est que la vitamine A et ses dérivés ont des effets biologiques similaires. Ces composés furent regroupés dans la famille des rétinoïdes (molécules qui sont dérivées du rétinol) [17]. L'existence de plusieurs rétinoïdes posait tout de même une question délicate : possèdent-ils tous un même rôle biologique en l'état, ou bien sont-ils mutuellement convertis en un seul composé (ou en un petit nombre de composés), qui induiraient les effets biologiques observés? Sans précisions sur le mécanisme moléculaire de leur action et l'existence d'un éventuel métabolisme des rétinoïdes, cette question ne reçut pas de réponse claire avant la seconde moitié du XXe siècle.

### 1.3 Les rétinoïdes dans la diète

Un apport alimentaire en vitamine A est nécessaire à plusieurs fonctions biologiques vitales ce qui indique que les animaux n'ont pas la capacité de la synthétiser *de novo* et donc que la diète doit fournir les composés susceptibles de compléter une carence. Il existe deux principales sources de vitamine A dans la diète : les sources d'origine végétales et animales.

#### 1.3.1 Les sources végétales de vitamine A

De très nombreux rétinoïdes furent découverts dans les végétaux (légumes, fruits, feuilles, algues), mais de façon intéressante, pas le rétinol lui-même. En fait, la plupart des pigments végétaux s'avèrent être des caroténoïdes (couleurs rouge, orange et jaune). Plusieurs scientifiques, notamment J.A. Olson et L.J. Machlin, montrèrent entre les années 1960 et 1980 que beaucoup de caroténoïdes sont convertis en rétinol dans l'organisme comme le  $\beta$ -carotène, l' $\alpha$ -carotène, l' $\alpha$ -cryptoxanthine [18-20]. Aujourd'hui, on estime qu'environ 10% de tous les caroténoïdes présents chez les végétaux sont des précurseurs potentiels du rétinol et de ce fait, ont une activité dite pro-rétinol [21]. Toutefois, l'efficacité de la conversion en rétinol est variable selon le caroténoïde. Elle est mesurée par le nombre de molécules de rétinol fournies par la conversion métabolique d'une molécule d'un caroténoïde donné [22]. Elle a lieu dans les cellules de la paroi de l'intestin grêle, et suit des voies métaboliques complexes que nous ne détaillerons pas ici (voir [18, 21] pour revue). Le rétinol ainsi formé est combiné avec différents acides gras par réaction d'estérification. Les esters de rétinol et d'acide gras produits (rétinyl-esters) sont incorporés dans les chylomicrons (des complexes macromoléculaires de protéines et de lipides) puis transportés dans la lymphe à partir des cellules de l'intestin grêle jusqu'au foie [23, 24], qui s'avère être l'organe principal de stockage de la vitamine A [25]. Le rétinol y est stocké sous forme de rétinyl-esters dans les cellules étoilées. Après hydrolyse des

rétinyl-esters, le rétinol libre est exporté au besoin dans la circulation où il est associé à une protéine de transport, la RBP (*retinol binding protein*) [20, 23, 25].

### 1.3.2 Les sources animales de vitamine A

Les sources animales de rétinoïdes sont constituées essentiellement de rétinol et de rétinyl-esters (principalement le rétinyl-palmitate) présents dans les divers tissus, mais essentiellement dans le foie et le sang, ainsi que dans les œufs et le lait. Le rétinol issu de sources animales est assimilé et métabolisé au niveau de l'intestin grêle puis intégré aux chylomicrons selon les mêmes voies que les rétinoïdes d'origine végétale [26]. En outre, plusieurs études ont établi que le rétinol était de très loin le rétinoïde majoritaire dans la circulation [27, 28], suggérant que c'était la forme biologiquement active des rétinoïdes. Mais cette question est demeurée controversée pendant plusieurs décennies avant d'être clairement élucidée.

### 1.4 L'AR est la forme biologiquement active principale de la vitamine A

J.F. Arens et D.A. Van Dorp furent les premiers à suggérer en 1946 que l'AR pouvait être la forme biologiquement active de la vitamine A. Ils observèrent que son administration à des rats carencés pouvait rétablir un développement normal chez les jeunes rats ainsi que restaurer l'état normal des différents épithéliums atteints par la carence. Cherchant à comprendre le métabolisme de l'AR chez ces rats, ils firent notamment l'hypothèse que l'AR pouvait être réduit enzymatiquement en rétinol dans l'organisme. Pourtant ils échouèrent à en détecter chez les rats carencés, même lorsqu'ils leur administraient de fortes doses d'AR [29]. Leur conclusion fut que l'AR ne pouvait pas être converti en rétinol. Un pas important fut franchi lorsque G. Wald et J.E. Dowling démontrèrent en 1960 que l'AR avait une activité biologique bien plus importante que le rétinol. Bien l'administration d'AR et de rétinol aient

des effets similaires, les doses d'AR nécessaires pour obtenir ces effets étaient de plusieurs ordres de grandeurs inférieures à celles de rétinol [30]. Ensuite un autre laboratoire fut en mesure de démontrer que le rétinol était converti en AR chez le rat [31], avec comme intermédiaire réactionnel la « vitamine A aldéhyde » ou rétinol [32, 33]. Dès lors il fut clair que l'AR était la forme biologiquement active des rétinoïdes, et dérive du rétinol, la forme de stockage et de transport dans l'organisme.

Une exception notable à ce dogme est la nature des rétinoïdes actifs dans la vision. Il fut démontré que le rétinol, en particulier son isomère 11-*cis*, était le pigment photosensible permettant la vision [34]. Toutefois, l'AR semblait être médiateur majeur de l'effet la vitamine A dans de nombreuses autres situations physiologiques. Mais son mode d'action exact n'était toujours pas connu. Les outils d'une discipline naissante, la biologie moléculaire, allaient permettre d'aller plus loin.

### 1.5 L'AR affecte la synthèse des protéines

En 1977, J.E. Blalock montra sur des cellules cultivées *in vitro* que l'AR bloquait la synthèse d'interféron. Cet effet est supprimé par un inhibiteur de la traduction (la cycloheximide) et par un inhibiteur de la transcription (l'actinomycine D). Cela suggérait que l'AR pouvait affecter la synthèse de protéines, peut-être par une action au niveau de la transcription de gènes [35]. Ce résultat fut ensuite confirmé avec les cellules F9 de tératocarcinome [36]. D'autres études ont montré ensuite que l'effet de l'AR sur l'expression de protéines était récapitulé par le rétinol, mais via sa conversion préalable en AR [37], suggérant par la même occasion que la conversion du rétinol en AR a lieu dans les cellules cibles de ce dernier.

## 2. Le mode d'action de l'AR

### 2.1 Concept de récepteur nucléaire

Un éclaircissement sur le mode d'action de l'AR vint de façon détournée, grâce aux résultats obtenus dans les années 1960 sur les hormones stéroïdiennes. Ces différentes molécules sont dérivées du cholestérol et sont synthétisées essentiellement dans des tissus glandulaires (tissus d'origine épithéliale dont les cellules sécrètent différentes substances comme les hormones). Par exemple, le cortex surrénal et les ovaires (ainsi que les testicules chez l'homme) produisent les androgènes, les ovaires, le  $17\beta$ -œstradiol ( $E_2$ ). Puis les hormones stéroïdiennes sont transportées par la circulation et agissent à distance sur une variété de tissus. Dans le cas de l' $E_2$ , la cible majeure, mais pas exclusive, est le système reproducteur, incluant la glande mammaire et l'utérus, mais aussi les os et le système nerveux. Nous reviendrons plus loin en détail sur la signalisation et les rôles physiologiques de l' $E_2$ , notamment dans la glande mammaire.

Le concept de récepteur nucléaire a été proposé pour expliquer les effets de l' $E_2$  sur les cellules. En effet, de nombreuses études, dont les travaux pionniers de Elwood V. Jensen avaient montré que cette hormone a la propriété d'induire séquentiellement la synthèse d'ARN, puis de protéines dans les cellules de l'utérus du rat [38-40]. E.V Jensen suggéra l'existence d'un récepteur nucléaire à l' $E_2$ , c'est-à-dire d'une protéine capable de le lier dans les cellules et de médier ses effets biologiques dans le noyau [41]. Plus tard des expériences de radio-liaison utilisant de l' $E_2$  radioactif permirent de démontrer que cette hormone lie son récepteur avec une affinité très élevée et que cette liaison n'est pas affectée par la compétition avec d'autres hormones stéroïdiennes comme la progestérone. Puis, dès le début des années 1980, plusieurs récepteurs nucléaires furent purifiés, partiellement séquencés et leurs ADNc furent clonés par criblage avec des oligonucléotides dégénérés ou des anticorps. Ce fut le cas pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR) [42, 43], de l' $E_2$  ( $ER\alpha$ ) [44-46], de la progestérone



(PR) [47-49] ainsi que de la vitamine D (VDR) [50, 51]. Les études subséquentes confirmèrent que ces récepteurs, dont ER $\alpha$ , lient leurs ligands de façon hautement spécifique et avec une forte affinité ( $K_D$  nanomolaire) [52]. La liaison du ligand induit à son tour l'association du récepteur avec l'ADN au niveau de séquences spécifiques, appelées éléments de réponse, ce qui affecte la transcription de certains gènes, qualifiés de gènes cibles. Les récepteurs nucléaires furent de ce fait qualifiés de facteurs de transcription ligand-inductibles.

Un nouveau paradigme semblait donc émerger, selon lequel l'effet des hormones stéroïdiennes pouvait s'expliquer par la modulation de l'expression de gènes spécifiques via les récepteurs nucléaires.

## 2.2 Les récepteurs nucléaires de l'AR



**Figure 2**

Représentation schématique de la structure modulaire des récepteurs nucléaires. Deux domaines d'activation de la transcription, AF-1 (ligand indépendant) et AF-2 (ligand dépendant) sont situés de part et d'autre d'un domaine de liaison à l'ADN.

### 2.2.1 Les RAR

Pierre Chambon suggérera en 1986 que l'AR pourrait être le ligand d'un de ces récepteurs nucléaires encore à découvrir [53]. Des expériences avaient en effet montré que l'AR pouvait être transféré jusque dans le noyau de cellules en culture probablement en raison de sa liaison à des protéines de transport

intracellulaires [54, 55]. Ces protéines de transport de l'AR semblaient être cytosoliques [56-58]. Or plusieurs observations semblaient justement montrer qu'il existait des sites de liaison de haute affinité pour l'AR dans le noyau de cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 [59]. Puis, grâce à des expériences de radio-liaison (consistant en l'incubation d'une solution purifiée de noyaux cellulaires avec de l'AR radioactif suivie de l'analyse par électrophorèse des extraits protéiques de noyaux), un autre laboratoire suggéra qu'il existait jusqu'à 3 sites distincts de haute affinité pour l'AR dans le noyau des cellules de testicules du rat. Les sites de liaison de l'AR dans le noyau, donc les récepteurs putatifs à l'AR, y étaient déjà présents préalablement à l'incubation avec l'AR. Ainsi l'accumulation d'AR dans le noyau ne résultait pas de la translocation des récepteurs du cytosol vers le noyau. Les protéines cytosoliques de transport de l'AR découvertes quelques années auparavant ne pouvaient donc pas être le récepteur à l'AR [60]. Ces trois récepteurs restaient toutefois à découvrir. Le premier récepteur nucléaire à l'AR fut identifié simultanément par les laboratoires de P. Chambon et R. Evans, et son ADNc cloné grâce à sa séquence similaire à celle des récepteurs ER $\alpha$  et VDR [61, 62]. Ce récepteur fut nommé *retinoic acid receptor* (RAR) et plus tard RAR $\alpha$ . Peu après, un second récepteur nucléaire de l'AR, RAR $\beta$ , distinct du premier, fut découvert [63], puis un troisième distinct des deux premiers, RAR $\gamma$  [64]. Des études plus détaillées de ces récepteurs ont montré qu'ils avaient une haute affinité pour l'AR ( $K_D$  inférieur à 10 nM) et que leur expression dans des cellules F9 en culture augmentent l'expression d'un gène rapporteur en présence d'AR [65]. Cette dernière étude a d'ailleurs permis pour la première fois l'identification d'une séquence d'ADN nécessaire à l'activité transcriptionnelle des RAR dans le promoteur du gène de la laminine B1 sans toutefois déterminer si les RAR lient directement l'ADN. Cela fut démontré un peu plus tard, en 1991, grâce à l'identification d'une autre séquence d'ADN présente dans le promoteur du gène de Crabp1 nécessaire à l'activité transcriptionnelle des RAR [66]. Cette étude démontra pour la première fois, par des expériences de retard sur gel, que les RAR lient l'ADN directement. De façon intéressante les trois isotypes de RAR

lient la même séquence d'ADN avec une affinité apparente similaire ce qui amenait la question de leur fonctions respectives *in vivo*.

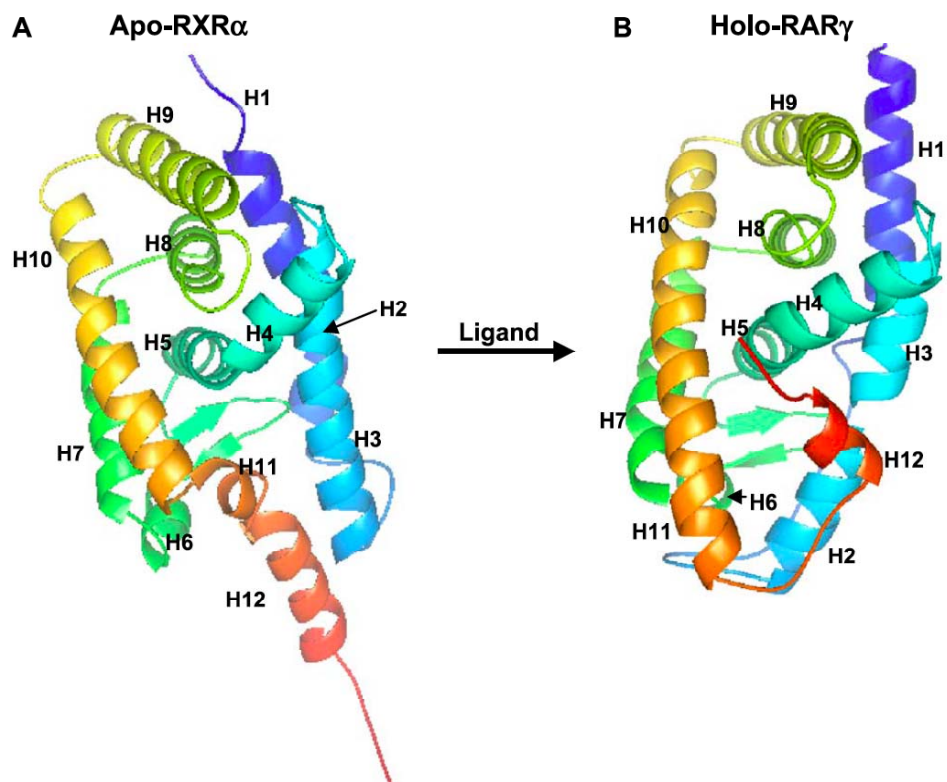
### 2.2.2 Les RXR

Curieusement la réalisation d'expériences de liaison *in vitro* des RAR avec leurs séquences d'ADN cibles semblaient indiquer que la présence des RAR seuls n'était pas suffisante pour assurer une liaison efficace à l'ADN [67]. Il fut ensuite démontré que les récepteurs RAR lient l'ADN comme hétérodimères obligatoires avec les récepteurs nucléaires RXR (*retinoid X receptor*) [68]. Il en existe trois, RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , dont les ADNc ont été clonés peu après ceux des RAR [68-70]. Il est apparu que la présence des RXR était nécessaire à la liaison des RAR à l'ADN [71, 72], ainsi qu'à leur activité transcriptionnelle [71]. Malgré des séquences primaires très proches de celle des RAR, les RXR ne lient toutefois pas l'AR tout-*trans*, comme les RAR, mais seulement l'isomère 9-*cis* de l'AR [73, 74].

### 2.2.3 Structure des récepteurs RAR et RXR

Les récepteurs de l'AR, RAR et RXR, ainsi que les autres récepteurs nucléaires connus ont des séquences très conservées dans deux domaines protéiques important pour leur activité et caractéristiques de la famille des récepteurs nucléaires, le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand [75]. On connaît aujourd'hui 48 récepteurs nucléaires humains [76], incluant par exemple les récepteurs des hormones stéroïdiennes comme ER $\alpha$  ou VDR, ou le récepteur de l'hormone thyroïdienne TR. Ils partagent une même structure modulaire (Figure 2), constituée d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine de liaison du ligand, dont le rôle est l'activation de la transcription par le ligand (qualifié aussi d'AF-2 ou *Activation Fonction-2*) qui contient aussi l'interface de dimérisation avec le partenaire et un domaine AF-1 (*Activation*

*Fonction-1*) dont le rôle est la modulation de la transcription mais de façon ligand-indépendante [75]. Des études structurales et fonctionnelles réalisées par cristallographie et par analyse RMN des récepteurs RAR et RXR, ont montré que le domaine de liaison à l'ADN, qui est le domaine le plus conservé entre les différents isotypes de RAR et de RXR [64] est constitué de deux doigts de zinc qui participent à la liaison à l'ADN en s'insérant notamment dans le sillon majeur de la double hélice [77-79]. C'est un type de repliement commun parmi les protéines qui interagissent avec l'ADN. Le domaine de liaison du ligand est le second domaine le plus conservé entre les différents isotypes de RAR et de RXR [64]. Il est essentiellement formé de douze hélices alpha, le site de liaison de l'AR étant composé d'une poche délimitée par des résidus hydrophobes issus des hélices H3, H4, H5 et H11, H12 [80, 81]. D'après ces dernières études, la liaison de l'AR induit un changement de conformation met en jeu le déplacement de l'hélice H12 qui vient en contact avec le ligand lui-même et qui stabilise sa liaison au récepteur (Figure 3).



**Figure 3**

Shémas du repliement tridimensionnel du domaine de liaison du ligand (LBD) de RXR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  déterminé par cristallographie.

Le degré d'identité élevé des séquences primaires ainsi que du repliement des LBD de RXR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  permet de comparer le changement de conformation observé après la liaison de l'AR. L'un des changements majeurs est le mouvement de l'hélice H12. Ces changements permettent le recrutement de coactivateurs (adapté de [82]).

## 2.3 Signalisation par l'AR

### 2.3.1 Les éléments de réponse à l'AR

Selon le modèle aujourd'hui communément admis, les effets physiologiques de l'AR sont médiés par ses récepteurs RAR et RXR qui agissent sous forme de dimères RAR-RXR [83, 84]. Il existe trois isotopes de RAR ainsi

que trois de RXR, chacun étant codé par un gène différent. En outre, pour chaque isotype il existe au moins deux isoformes (voir plus..) générés par épissage alternatif et/ou par l'existence pour un même gène de plusieurs promoteurs. Les isoformes (nommés RAR $\alpha$ 1, RAR $\alpha$ 2, RAR $\beta$ 1, RAR $\beta$ 2 etc...) diffèrent à leur extrémité N-terminale exclusivement [85].

Chaque isoforme de RAR peut potentiellement s'associer avec n'importe quel isoforme de RXR pour lier l'ADN [86]. Cela suggère une grande diversité combinatoire de dimères RAR-RXR, ce qui pourrait contribuer à la régulation fine de l'action de l'AR dans divers tissus cibles, selon les isoformes qui y sont exprimées. Les dimères RAR-RXR s'associent à l'ADN au niveau de séquences cibles spécifiques nommées RARE (*retinoic acid response element*). Elles sont constituées de deux séquences (2 demi-sites) directement répétées de 6 nucléotides conservés de type (A/G)G(G/T)TCA séparées par 2 ou 5 nucléotides variables [87, 88]. La structure cristallographique de dimères de RAR-RXR lié à l'ADN a été établie, elle montre que chaque récepteur lie un demi-site de l'élément de réponse à l'AR [89-93]. Certaines variations de la séquence consensus peuvent aussi être liées, ce qui est mieux reflété dans une représentation matricielle de ces sites [86]. Il a aussi été proposé que les hétérodimères de RAR-RXR ainsi que des homodimères de RXR pouvaient lier *in vitro* des séquences répétées séparées par un seul nucléotide mais ce fait est encore discuté car peu d'exemples naturels ont été rapportés [94, 95]. La fréquence élevée des RARE dans le génome indique que les dimères RAR-RXR peuvent potentiellement réguler de larges réseaux de gènes [96].

### 2.3.2 La répression transcriptionnelle en absence d'AR

Il a été proposé que les dimères de récepteurs RAR-RXR sont associés en permanence à l'ADN, même en l'absence de l'AR, contrairement aux récepteurs des hormones stéroïdiennes qui sont liés à des protéines de choc thermique (notamment hsp90) dans le cytosol et dont la translocation dans le noyau et

liaison à l'ADN est induite par leurs ligands. Les récepteurs à l'AR ne sont d'ailleurs pas associés à hsp90 [97]. Cependant les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine indiquent que le ligand stabilise la liaison des dimères de récepteur RAR-RXR à l'ADN [91, 98]. Il a été récemment suggéré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine effectuées avec des cellules de carcinome mammaire MCF-7 que les sites de liaison à l'ADN de RAR $\alpha$  (mais pas de RAR $\beta$  ou  $\gamma$ ) corrélaient souvent à l'échelle du génome entier avec les sites de liaison du facteur de transcription FoxA1 ainsi que dans une moindre mesure ceux de GATA-3, mais la signification de ce résultat est encore discuté [99, 100].

Sous leur forme apo, les récepteurs participeraient à la répression de l'expression de gènes cibles de l'AR via le recrutement de corépresseurs de la transcription [101, 102]. La répression de la transcription par les dimères apo-RAR-RXR pourrait jouer un rôle physiologique important, notamment dans le développement embryonnaire de la souris [103]. En absence d'AR, les dimères de RAR-RXR recrutent des corépresseurs de type NCoR (*Nuclear CoRepressor*) et SMRT (*silencing mediator of RAR and thyroid hormone receptor*) via leur séquence consensus LXXXIXXX(I/L) (ou L est une leucine, I une isoleucine et X n'importe quel acide aminé) [104]. Les corépresseurs agissent notamment via le recrutement Sin3A/B-dépendant de protéines à activité HDAC (*histone deacetylase*), comme par exemple HDAC-1 ou HDAC-3 [105], ce qui induit une hypoacétylation locale des histones, donc une compaction de la chromatine [106]. Ce phénomène participe à la répression de la transcription [107]. Il existe aussi des co-répresseurs dont l'activité dépend de la liaison de l'AR sur les récepteurs comme NRIP/RIP140 [108, 109], ce qui suggère que dans certains cas l'AR peut aussi réprimer activement l'expression de gène via ses récepteurs. Un rôle similaire a été pour le corepresseur ligand-dépendant LCoR (*Ligand-dependent nuclear receptor corepressor*) qui semble médier la répression de la transcription de certains gènes induite par l'AR [110, 111]. Enfin, il a été montré que la protéine SUZ12 (un membre du groupe de protéines polycomb), qui est

l'un des membres du complexe de remodelage de la chromatine PRC2/3, et qui est impliquée dans la repression de la transcription des gènes Hox [112, 113], est recrutée aux sites de liaison des dimères RAR-RXR au niveau du promoteurs de plusieurs gènes (CYP26A1, RAR $\beta$ 2..) en l'absence d'AR et que la présence d'AR induit la dissociation de SUZ12 de ces mêmes sites [114]. La contribution de SUZ12 à la répression de la transcription par les dimères RAR-RXR ne semble cependant pas établie, le rôle de cette protéine dans ce contexte demeure donc obscur [115].

### 2.3.3 Activation de la transcription par l'AR

La liaison de l'AR aux récepteurs induirait un changement de leur conformation, notamment le mouvement de l'hélice H12 du LBD nous l'avons vu (Figure 3), puis la dissociation subséquente des corépresseurs (Figure 4). Il permettrait simultanément l'exposition de surfaces de recrutement pour des coactivateurs, situées sur le domaine AF-2 (domaine de liaison du ligand) de RAR et de RXR, résultant en une activation de la transcription des gènes cibles [116]. Les coactivateurs sont recrutés via de petites séquences alpha-hélicale de type LXXLL (ou L est une leucine et X n'importe quel acide aminé). Certaines de ces protéines ont une activité HAT (*histone acetyl-transferase*), ou recrutent d'autres protéines ayant cette activité, et induisent une augmentation du degré d'acétylation des histones, donc une décompaction locale de la chromatine, ce qui participe à l'activation du niveau de transcription de gènes en trans. C'est le cas par exemple, des membres de la classe de co-activateurs p160, SRC-1, SRC-2 (GRIP-2, TIF-2), SRC-3 (ACTR, AIB1, p/CIP, RAC3, TRAM-1) [117-120], qui interagissent avec les protéines HAT CBP/p300 et pCAF. De plus, des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants de type SWI/SNF, qui induisent le déplacement des nucléosomes sont également recrutées par les récepteurs nucléaires (Figure 4 et [82]).



Toutes ces protéines effectrices ont pour fonction de faciliter la décompaction de la chromatine dans les régions régulatrices de gènes cibles de l'AR et de permettre le recrutement d'autres facteurs de transcription et du complexe médiateur d'initiation de la transcription [82, 121].

D'autres coactivateurs existent, mais leur activité est moins bien comprise comme SUG1, l'une des sous-unités du protéasome, qui semble être impliquée dans le contrôle de la transactivation par l'AR via la dégradation de RAR $\alpha$  [122]. Depuis quelques années plusieurs études semblent avoir établi un lien entre la voie de dégradation du protéasome et la fonction d'activation de la transcription des dimères RAR-RXR. En effet, il était déjà connu que RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$  étaient ubiquitinés et dégradés par le protéasome après activation de la transcription sous l'effet de la liaison de l'AR [123, 124]. La dégradation de RAR et de RXR par le protéasome semble en outre nécessaire à l'activation de la transcription de gènes cibles de l'AR [125]. Toutefois il a été récemment suggéré que l'activité de la sous-unité 26S du protéasome est nécessaire à la liaison à l'ADN des dimères RAR-RXR ainsi qu'au recrutement subséquent de coactivateurs [126].

#### 2.3.4 Modulation de l'activité transcriptionnelle de l'AR par modifications post-traductionnelles.

La régulation transcriptionnelle des gènes cibles par l'AR, qui est médiée par le domaine AF-2 des RARs, est aussi modulée par des modifications post-traductionnelles de RAR et RXR, incluant la phosphorylation de nombreux résidus différents, induites par diverses voies comme la voie p38MAP-kinase, les voies de la PI3K-AKT, de ERK, de la PKA et PKC ainsi que plusieurs *cyclin-dependant kinases* (CDK7, CDK8). Ces phosphorylations modifient notamment la capacité de recrutement des coactivateurs par les dimères RAR-RXR et de ce fait modulent les niveaux d'expression des gènes cibles de l'AR [82]. Les différentes isoformes de RAR et de RXR ne semblent pas toujours être la cible

des mêmes kinases, ce qui suggère la possibilité d'une régulation spécifique de la voie de l'AR par différentes voies de signalisation en fonction de l'isoforme du récepteur qui est impliquée [121].

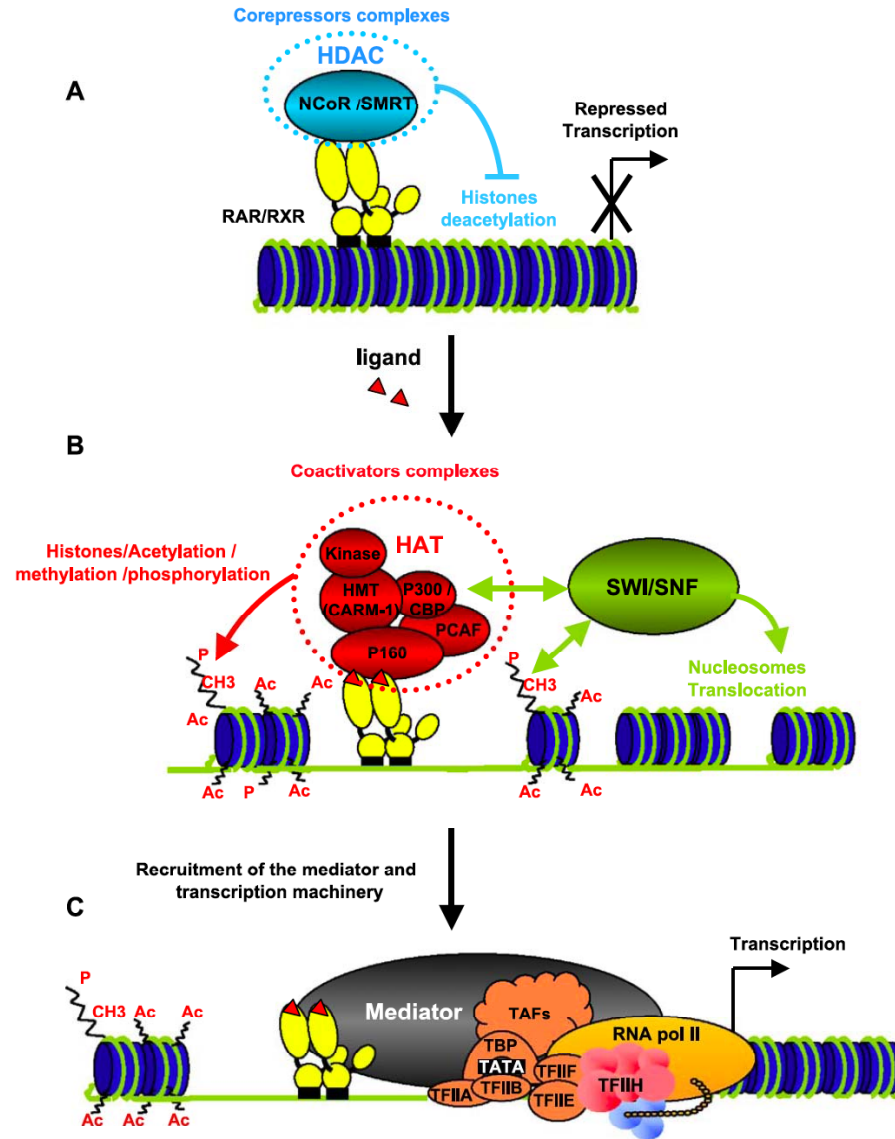
Les récepteurs RXR sont aussi les partenaires d'environ 30% des récepteurs nucléaires connus. En plus des RAR, les RXR dimerisent avec plusieurs récepteurs nucléaires comme les PPAR (*peroxysome proliferator-activated receptors*), le VDR, PXR (*pregnane X receptor*), LXR (*liver X receptor*) et beaucoup d'autres récepteurs nucléaires orphelins [76, 127, 128]. Cela indique que les RXR sont au croisement de nombreuses voies de signalisation et suggère la possibilité d'une influence de ces voies sur celle de l'AR, par exemple par la compétition entre les RAR et tous les autres partenaires possibles des RXR. Des cas d'une telle compétition entre différents récepteurs nucléaires partenaires des RXR ont été répertoriés comme entre PPAR $\alpha$  ou  $\beta$  et LXR [129, 130], PPAR $\gamma$  et TR [131], ainsi que VDR et TR [132] bien que, jusqu'ici, il n'y ait pas d'exemples mettant en jeu l'un des isotypes de RAR en compétition avec un autre récepteur nucléaire pour la liaison avec l'un des isotypes de RXR.

### 2.3.5 L'isomère 9-*cis* de l'AR

Il existe plusieurs stéréo-isomères de l'AR, les différentes liaisons doubles de la chaîne poly-isoprène pouvant avoir une conformation *cis* ou *trans*. Plusieurs études ont montré que les RXR ne peuvent lier que l'isomère 9-*cis* de l'AR, tandis que les RAR peuvent lier aussi bien l'isomère 9-*cis* que le tout-*trans* mais pas d'autres isomères [133]. Toutefois, l'existence de l'AR 9-*cis* *in vivo* est controversée car une seule étude a décrit sa détection dans des tissus de souris par analyse HPLC [74]. Cela est peut-être dû à un manque de méthodes d'analyses suffisamment sensibles. En outre, un rôle de l'AR 9-*cis* a été exclu dans certaines situations physiologiques, comme dans la peau chez la souris, par

une élégante approche génétique et pharmacologique (utilisation d'agonistes et d'antagonistes des RAR et RXR) [134]. La question de la fonction physiologique de l'AR *9-cis* reste donc en suspens [135]. Le fait que les isotypes de RXR puissent lier l'AR *9-cis* pose la question du rôle respectif de chaque partenaire du dimère RAR-RXR dans la fonction d'activation de la transcription. Or il a été montré que la liaison d'un ligand au partenaire RAR, mais pas au RXR, suffit à induire la dissociation des coactivateurs du dimère RAR-RXR [136]. Ce phénomène a été baptisé « subordination du RXR ». Toutefois la liaison simultanée d'un ligand à chacun des partenaires du dimère RAR-RXR semble induire la dissociation des corepresseurs et le recrutement des coactivateurs de façon synergique [137]. Or il a été proposé que les RXR puissent avoir d'autres ligands que l'AR *9-cis*, comme certains acides gras [135]. Cela indique que d'autres voies de signalisation ou de voies métaboliques pourraient moduler l'activité transcriptionnelle des dimères RAR-RXR via le partenaire RXR.

Il a en outre été montré chez la souris, que le développement des testicules dépend des trois isotypes de RAR mais curieusement, indépendamment des RXR. En effet, la délétion génétique des trois isotypes de RXR ne récapitule pas le phénotype obtenu dans ce tissu lors de la délétion des trois isotypes de RAR [138].



**Figure 4**

Schéma simplifié des mécanismes de répression/activation de la transcription par les récepteurs à l'AR. En l'absence d'AR les récepteurs à l'AR recrutent des corepresseurs de la transcription (A). La liaison de l'AR au récepteurs induit la dissociation des corepresseurs et le recrutement de divers coactivateurs de la transcription par les récepteurs à l'AR (B) puis le recrutement subséquent du complexe médiateur de la transcription (C) (adapté de [82]).

## 2.4 Études génétiques de la signalisation de l'AR

Plusieurs groupes de recherches ont entrepris depuis quelques années des études *in vivo* de la voie de l'AR en utilisant les nouveaux outils de la génétique, en particulier les animaux transgéniques. Différents modèles d'animaux ont été générés dans lesquels le gène de l'un ou l'autre des récepteurs RAR ou RXR était supprimé ou muté de façon homozygote, notamment via le système de recombinaison homologe Cre-Lox [139], technique éventuellement combinée à des approches d'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation de l'AR, afin d'étudier l'effet pendant le développement embryonnaire ou à l'âge adulte de chacun des récepteurs.

Un grand nombre d'études ont été publiées sur le sujet, par soucis de synthèse, nous nous en tiendrons aux conclusions générales, qui ont été passées en revue notamment par Pierre Chambon et ses collaborateurs. Plusieurs études avaient déjà démontré l'importance du rôle des RAR dans le développement embryonnaire, particulièrement dans l'établissement de l'axe antéropostérieur, de l'axe de symétrie droite-gauche, ainsi que dans la segmentation de l'embryon et l'apparition des membres [140].

De façon surprenante, la suppression de chaque isoforme de RAR chez la souris n'a que peu d'effets sur l'embryon ou l'adulte. Ces animaux sont viables, mais présentent certaines malformations pendant le développement ou d'atteinte post-natales très localisées à certains tissus où le récepteur supprimé est normalement exprimé. Dans chaque cas, le phénotype obtenu récapitule une partie des atteintes observées lors de carences en vitamine A [7] comme un retard de croissance marqué, une dégénération des testicules, des malformations oculaires, des poumons et du squelette, la métaplasie avec kératinisation de divers épithélium. Cela a pu confirmer que les récepteurs RAR/RXR sont bel et bien les médiateurs de l'action de l'AR *in vivo*. La relative légèreté des phénotypes obtenus par la suppression d'un seul RAR a été attribuée à un certain niveau de redondance fonctionnelle des récepteurs dont les schémas d'expression

spacio-temporels peuvent se recouper. Pour tester cette hypothèse, des mutants ou deux isotypes de RAR sont supprimés génétiquement ont été générés. Les phénotypes obtenus par la suppression simultanée de deux récepteurs ont en effet été beaucoup plus sévères. La double suppression de  $RAR\alpha/RAR\beta$ ,  $RAR\alpha/RAR\gamma$  et  $RAR\beta/RAR\gamma$  est létale à l'état embryonnaire ou à la naissance, en raison de graves et nombreuses malformations, similaires à celles qui sont observées dans une situation de carence en vitamine A [83].

La suppression génétique de chacun des trois isotypes de RXR a moins d'effets que la suppression des RAR, sauf en ce qui concerne  $RXR\alpha$ . La suppression de  $RXR\alpha$  cause de nombreuses et diverses malformations, en particulier au cœur, ce qui entraîne la mort *in utero* des embryons par insuffisance cardiaque [83]. Cela suggère que  $RXR\alpha$  est le principal isotype de RXR impliqué dans le développement embryonnaire, du moins chez la souris. Ce fait est appuyé par le fait que la double suppression de  $RXR\beta/RXR\gamma$  n'a pas d'effets majeurs sur l'embryon. Les défauts de développement causés par la suppression de  $RXR\alpha$  ressemblent à ceux qui sont observés dans le cas de déficience en vitamine A. Toutefois les RXR sont aussi les partenaires de dimérisation de nombreux récepteurs nucléaires et il se peut que la suppression de  $RXR\alpha$  affecte d'autres voies de signalisation.

Les outils de la génétique ont permis de démontrer l'importance du rôle des récepteurs à l'AR pendant le développement embryonnaire et à l'âge adulte, mais en raison de possibles redondances fonctionnelles limitant l'effet de la suppression d'un seul récepteur, la fonction spécifique de chaque récepteur à l'AR n'a pu être finement déterminé, en particulier à l'âge adulte. Toutefois les preuves de rôles spécifiques pour chacun des isotypes de RAR existent, comme chez les cellules de tératocarcinome F9, où  $RAR\alpha$  et  $RAR\gamma$  semblent chacun réguler des réseaux de gènes différents [141].

### 3. Métabolisme de l'AR dans les cellules cibles

L'AR représente moins de 1% du total des rétinoïdes présents dans le sang, ce qui est trop peu pour activer efficacement l'expression de gènes [28, 142]. En l'absence de glande dévolue, la synthèse locale d'AR les cellules cibles à partir du rétinol circulant est donc nécessaire, bien que, dans plusieurs cas, une communication paracrine par l'AR ait été mise en évidence [143, 144]. Les cellules cibles de l'AR expriment les récepteurs RAR et RXR, mais aussi les enzymes de la voie de synthèse de l'AR. Cela suggère qu'en plus d'une régulation de la signalisation de l'AR au niveau transcriptionnel, il pourrait exister un autre niveau de régulation de la signalisation de l'AR par la modulation de la voie de synthèse et donc du niveau d'AR dans la cellule.

#### 3.1 Les protéines de transport des rétinoïdes

Les rétinoïdes ont une nature lipidique. À ce titre ils sont très peu solubles dans le sang et dans le milieu intracellulaire. De ce fait, il existe plusieurs protéines de transport susceptibles de les convoier dans l'organisme et dans les cellules.

##### 3.1.1 Le rétinol dans le sang

Dans le sang, le rétinol existe sous au moins deux formes, les rétinyl-ester incorporés dans les chylomicrons ainsi que le rétinol libre, associé à la protéine de transport RBP, découverte par P.A. Peterson [145] et dont l'ADNc fut cloné plus tard, en 1984 [146]. L'hypothèse actuelle serait que les chylomicrons permettent le transport des rétinyl-esters après leur absorption dans la paroi de l'intestin grêle, jusqu'au foie pour le stockage tandis que la RBP transporterait le rétinol du foie jusqu'aux tissus périphériques ou se situent les cellules cibles de l'AR. La suppression de la RBP chez la souris induit un phénotype de déficience en vitamine A [147] qui s'apparente à celui observé chez l'humain, chez des

patient portant une mutation entraînant l'inactivation du gène de RBP [148]. Ce phénotype est cependant relativement léger, ce qui indique que d'autres voies de transport, comme celle des chylomicrons, pourraient exister en parallèle et compenser partiellement la perte de RBP pour le transport du rétinol (sous forme de rétinyl-esters) aux cellules cibles de l'AR, par un mécanisme inconnu. En outre, l'albumine du sang est connue pour lier les rétinoïdes de façon non spécifique et pourrait ainsi contribuer au transport du rétinol et de l'AR [149].

### 3.1.2 Le récepteur membranaire STRA6

Plusieurs groupes ont émis, dans les années 1970, l'hypothèse qu'il pouvait exister un récepteur membranaire à la RBP-rétinol à la surface des cellules cibles de l'AR. Ce n'est que récemment que ce récepteur a été identifié, cloné et caractérisé. Il s'agit de STRA6, une protéine transmembranaire, qui lie la RBP-rétinol avec une forte affinité ( $K_D$  de 59 nM) et facilite l'entrée du rétinol dans les cellules [142, 150]. En outre, l'expression de STRA6 a été détectée dans plusieurs tissus cibles de l'AR chez la souris, que ce soit chez l'embryon, le placenta, les testicules [151]. STRA6 semble aussi exprimée dans la peau et les poumons chez l'homme [152].

### 3.1.3 Transport des rétinoïdes dans les cellules

Plusieurs protéines de transport des rétinoïdes dans les cellules ont été découvertes. Leurs propriétés et spécificités de liaisons ont été caractérisées pour les différents rétinoïdes par plusieurs auteurs [153-156]. Il en existe deux familles, les CRBP (*cellular retinol binding protein*) et les CRABP (*cellular retinoic acid binding protein*).



### 3.1.3.1 Les CRBP

Les CRBP sont au nombre de trois, CRBPI, CRBP<sub>II</sub> et CRBP<sub>III</sub>. Toutes peuvent lier le rétinol avec une forte affinité ( $K_D$  inférieur à 10 nM), CRBPI et CRBP<sub>II</sub> peuvent aussi lier le rétinal [155]. Il semble que CRBPI ait un rôle dans le stockage du rétinol sous forme de rétinyl-esters dans le foie [157-159]. CRBP<sub>II</sub> serait impliquée dans l'estérification du rétinol dans les cellules de la paroi de l'intestin grêle [160]. Mais peu d'études ont été consacrées à cette dernière et un rôle dans la voie de signalisation ou de synthèse de l'AR n'est pas confirmé à ce jour. CRBP<sub>III</sub> reste la moins bien caractérisée des CRBP et sa fonction physiologique reste pour l'instant obscure, bien qu'il semble qu'elle ait un rôle dans le métabolisme énergétique [160].

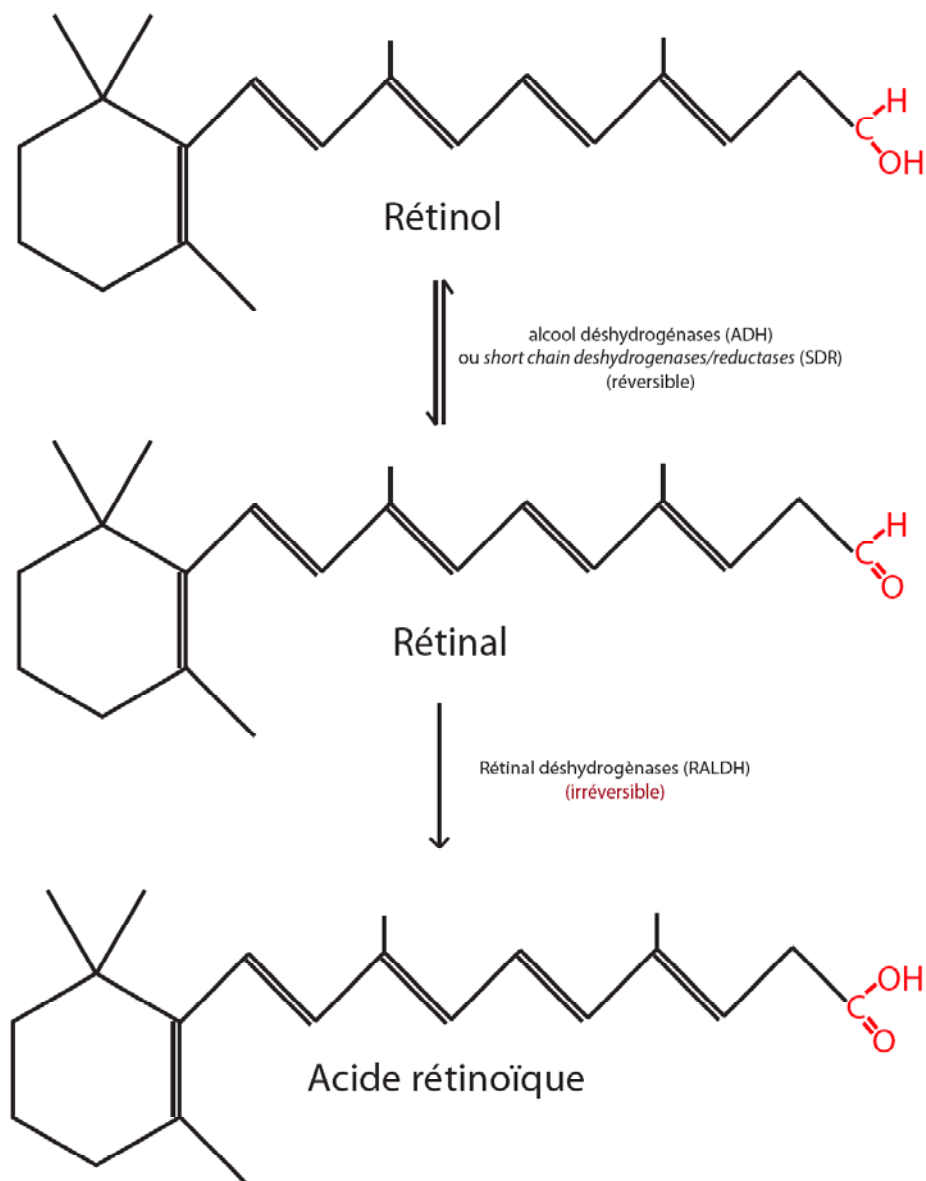
### 3.1.3.2 Les CRABP

L'autre famille de transporteurs des rétinoïdes comprend deux membres, CRABPI et CRABP<sub>II</sub>. Ces protéines lient l'AR avec une haute affinité, mais pas le rétinol ou le rétinal [161]. Plusieurs groupes ont montré que l'expression de CRABPI dans des modèles cellulaires sensibles à l'AR rendait les cellules insensibles à ses effets. Cette protéine serait donc un régulateur négatif de la signalisation par l'AR [162-164]. Il a été proposé par plusieurs auteurs, notamment par J.L. Napoli que CRABPI pourrait être impliquée dans le catabolisme de l'AR [165-167]. Il a par ailleurs été montré chez le modèle cellules F9 de tératocarcinome que plus le niveau de CRABPI exprimé est élevé, plus le taux de catabolisation de l'AR est augmenté, ce qui pourrait expliquer l'effet négatif de CRABPI sur la signalisation de l'AR [168].

En revanche, CRABP<sub>II</sub> semble avoir un rôle positif dans la signalisation par l'AR. L'expression de CRABP<sub>II</sub> dans la lignée cellulaire COS-7 augmente la transactivation d'un gène rapporteur de l'AR. Le mécanisme mis en jeu implique une interaction directe entre les récepteurs RAR et CRABP<sub>II</sub>. Il semble que CRABP<sub>II</sub> soit un coactivateur transcriptionnel des dimères de récepteurs RAR-

RXR [169]. Cette protéine a une localisation cytosolique en l'absence d'AR, mais la liaison de l'AR induit un changement de sa conformation qui expose un signal de localisation nucléaire. Celle-ci est donc transloquée dans le noyau quand elle est associée à l'AR [170]. Son rôle serait donc de transporter l'AR du cytosol jusqu'aux récepteurs à l'AR dans le noyau, avec lesquels elle interagit physiquement [171, 172].

Il est à noter que la délétion génétique de CRABPI, de CRABPII ou combinée de CRABPI et CRABPII n'a pas d'effet visible chez la souris pendant le développement embryonnaire ou l'âge adulte, ce qui pose la question de leurs rôles physiologiques respectifs [173].



**Figure 5**

Schéma de la voie de synthèse de l'acide rétinoïque à partir du rétinol.

Dans les cellules, le rétinol subit une première étape d'oxydation enzymatique en rétinol. Cette activité est ubiquitaire. Puis le rétinol est à son tour oxydé de façon irréversible en acide rétinoïque. Cette seconde étape est catalysée par les RALDH dont l'expression est spécifique à certains tissus épithéliaux cibles de l'AR.

## 3.2 Les enzymes de synthèse de l'AR

Selon le modèle le plus largement accepté aujourd'hui, cette voie de synthèse comporte deux étapes successives d'oxydation. La première consiste en l'oxydation enzymatique réversible du rétinol en rétinal, qui est un intermédiaire réactionnel. Puis une seconde étape d'oxydation enzymatique irréversible du rétinal permet la production d'AR (Figure 5). Nous allons maintenant présenter une synthèse des données qui appuient ce modèle.

### 3.2.1 Oxydation du rétinol en rétinal

Deux familles principales d'enzymes sont impliquées dans l'oxydation du rétinol en rétinal, les ADH, ou *alcohol dehydrogenase* et les SDR, ou *short-chain dehydrogenase-reductase* (Figure 5).

#### 3.2.1.1 Les ADH

Environ une demi-douzaine d'ADH ont été identifiées. Mais seulement trois, ADH1, ADH3 et ADH4, semblent impliquées dans la synthèse d'AR *in vivo*. Elles ont une activité d'oxydation du rétinol en rétinal *in vitro* (Figure 5) [174-177]. Il a été proposé qu'ADH3 pourrait avoir un rôle majeur dans la synthèse d'AR *in vivo*, ce qui s'explique probablement par son expression ubiquitaire malgré un niveau d'activité enzymatique plus faible qu'ADH1 et ADH4 [178]. En effet, ces deux enzymes ont des niveaux d'activité de près de trois ordres de grandeur plus élevés qu'ADH3. Mais leurs expressions sont beaucoup plus restreintes et sont localisées essentiellement dans les épithéliums de quelques organes, ce qui peut expliquer le phénotype limité obtenu lors de leur suppression génétique chez la souris. En outre, ADH3 est souvent exprimée aux sites où l'on trouve ADH1 et ADH4 et pourrait compenser leur absence [158, 176, 177, 179, 180]. Il est important de noter que l'expression ubiquitaire

d'ADH3 suggère que l'activité d'oxydation du rétinol en rétinol est elle-même ubiquitaire dans l'organisme.

### 3.2.1.2 Les SDR

Une étude a montré, il y a près de 20 ans, qu'il existait une activité microsomale d'oxydation du rétinol en rétinol [181]. Plusieurs enzymes microsomales impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes, les SDR, ont depuis été identifiées et caractérisées chez l'homme le rat et la souris [182, 183]. Elles sont relativement nombreuses (plus d'une dizaine) et leurs niveaux d'activité semblent être très inférieurs à ceux des ADH [183]. Bien que relativement différentes les unes des autres, ces enzymes peuvent être réparties en deux classes en fonction du cofacteur utilisé, soit le  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , soit le  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  [183, 184]. Plusieurs SDR, comme DHRS9, RDH11 ou RDH12, ont une activité avec le rétinol et peuvent participer à la synthèse du rétinol à partir de rétinol dans des cellules en culture [185, 186]. L'oxydation du rétinol en rétinol est une réaction réversible (Figure 5), et plusieurs SDR peuvent catalyser la réduction du rétinol en rétinol *in vitro* [183]. Cela suggère que ces enzymes pourraient notamment avoir un rôle dans la régulation de l'équilibre de la réaction de synthèse du rétinol. L'une d'entre elles au moins (11-*cis*-RDH) semble impliquée dans la synthèse de rétinol 11-*cis*, le pigment photosensible impliqué dans la vision, il s'agit donc d'un acteur important du cycle visuel. Il a d'ailleurs été rapporté que des mutations de cette enzyme peuvent causer des défauts de la vision chez l'homme [187]. Parmi ces enzymes, une seule, RDH10, a un rôle démontré dans la synthèse d'AR *in vivo*. Cette enzyme possède une activité d'oxydation du rétinol en rétinol *in vitro* [188, 189]. Cette enzyme participe à la synthèse d'AR, via la synthèse de rétinol, pendant le développement embryonnaire chez la souris et son absence cause de graves et fatales malformations qui sont réversibles par l'administration d'AR à la mère [190]. Le rôle d'autres SDR dans la voie de synthèse d'AR *in vivo* n'est pour l'instant pas démontré.

### 3.2.2 L'oxydation du rétinol en AR

Nous venons de voir que plusieurs enzymes ont une activité de synthèse de rétinol *in vitro*. L'expression ubiquitaire de l'une d'entre elles, ADH3, suggère que la synthèse de rétinol est aussi ubiquitaire. La synthèse subséquente d'AR est catalysée par les enzymes de la famille des rétinol déshydrogénases, les RALDH, dont l'expression est plus restreinte, spécifique à certains tissus. Ces enzymes ont été découvertes grâce à leur activité d'oxydation du rétinol par J.L. Napoli [191-193].

#### 3.2.2.1 Les ALDH

Les rétinol déshydrogénases (RALDH) catalysent la synthèse irréversible d'AR à partir du rétinol. Ce sont des enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases, ou ALDH, qui comprend une vingtaine de membres chez l'animal [194, 195].

La plupart de ces protéines sont impliquées dans la détoxification de la cellule et participent notamment à l'élimination des aldéhydes. En effet, de nombreuses voies métaboliques génèrent des aldéhydes comme le catabolisme des acides aminés, les voies impliquant des sucres, des lipides ainsi que des hormones et des neurotransmetteurs [194, 196, 197]. La dégradation des lipides des membranes cellulaires sous l'effet d'un stress oxydatif est aussi un phénomène qui génère de nombreux aldéhydes différents (plus de 200 sont connus) qui ont des effets toxiques sur la cellule [198]. Ce sont des composés qui ont des propriétés électrophiles très marquées en raison de leur groupe carbonyle terminal, ce qui en fait des molécules très réactives. Contrairement aux espèces réactives de l'oxygène, ils ont une durée de vie assez longue, ce qui les rend d'autant plus dommageables pour la cellule [199]. Les aldéhydes libres peuvent réagir, et se lier de façon covalente, avec de nombreuses molécules.

Cette réactivité peut perturber diverses fonctions cellulaires [200, 201]. Les ALDH catalysent l'oxydation d'une grande variété d'aldéhydes en leur acide carboxylique correspondant. Un rôle dans la protection contre l'accumulation d'aldéhydes et le stress oxydatif a été démontré pour plusieurs d'entre elles [202-204].

### 3.2.2.2 Mécanisme réactionnel

Des études structurales par cristallographie et des méthodes biophysiques ont permis de mieux comprendre le repliement de ces protéines, d'une masse d'environ 50 à 55 KDa, et ont contribué à disséquer leur mécanisme de catalyse [205-208]. Il s'agit globalement d'une réaction d'oxydation par déshydrogénation d'un substrat aldéhyde, dont le produit est un acide carboxylique.

Les ALDH sont constituées d'un domaine catalytique, d'un domaine de liaison du cofacteur  $\text{NAD}^+$  ou  $\text{NADP}^+$  ainsi que de deux domaines d'oligomérisation. Leur repliement crée un tunnel dont les parois sont constituées d'acides aminés provenant des différents domaines. Selon le modèle communément proposé, les résidus qui composent les parois du tunnel déterminent la spécificité de chaque ALDH pour des substrats particuliers [209, 210]. Le mécanisme catalytique mis en jeu est relativement bien connu grâce à diverses études à ce sujet (voir la revue de S.A. Marchitti et collègues, [199]). Nous ne le décrirons pas en détail ici, mais il est important de noter que plusieurs résidus sont importants, dont la cystéine catalytique typique des ALDH en position 302 et le glutamate en position 280 (cette position varie légèrement en fonction de l'ALDH considérée) [206]. D'après le modèle accepté, l'atome de soufre de la cystéine catalytique est un nucléophile qui attaque l'atome de carbone de la fonction aldéhyde du substrat, résultant en un intermédiaire thio-hémiacétal ou l'aldéhyde est lié de façon covalente à l'enzyme. Puis le glutamate 280, via sa fonction amine, active une molécule d'eau, qui participe ensuite

l'hydrolyse de l'intermédiaire thio-hémiacétal, libérant l'acide carboxylique et l'enzyme [210].

### 3.2.2.3 Les RALDH

Plusieurs ALDH susceptibles d'oxyder le rétinol en AR ont été identifiées et une nomenclature unifiée a été proposée pour ces enzymes par homologie avec celle des cytochromes P450 [195]. Toutefois, une autre nomenclature d'usage courant coexiste avec la nomenclature officielle pour les ALDH qui oxydent le rétinol, les RALDH, ou rétinol déshydrogénases. Ces enzymes sont au nombre de trois et ont été nommées RALDH1 (pour ALDH1A1 dans la nomenclature officielle), RALDH2 (pour ALDH1A2), RALDH3 (pour ALDH1A3). Une quatrième enzyme a été identifiée, RALDH4 (pour ALDH8A1), mais elle est beaucoup plus divergente et sa place dans la famille des RALDH est encore discutée.

Ces enzymes ont d'abord été identifiées chez la souris ou le rat, mais des orthologues ont été ensuite découverts chez diverses espèces comme l'homme, le singe, le poisson zèbre et le poulet. Elles sont extrêmement conservées: il y a environ 85% d'identité de séquence entre les orthologues de RALDH1 chez des espèces aussi éloignées que l'homme, le poulet et la souris (et près de 95% de similarité). Le degré de conservation est similaire pour les orthologues de RALDH2, 3 et 4. Cela suggère que ces enzymes ont des rôles physiologiques importants et conservés. Il est important de noter qu'elles sont exprimées spécifiquement au niveau de plusieurs épithélia dont l'état de différenciation est contrôlé par l'AR [182].



### 3.2.2.4 RALDH1

#### 3.2.2.4.1 RALDH1 participe à la synthèse d'AR *in vivo*

L'ADNc de RALDH1 a d'abord été cloné à partir de tissu de rat [193]. Cette enzyme est un tétramère en solution qui reconnaît le rétinol comme substrat, y compris lorsqu'il est associé à la protéine de transport CRBPI, ce qui renforce l'idée d'un rôle dans la voie de synthèse d'AR *in vivo* [211]. L'expression de RALDH1 a été détectée dans les épithéliums de divers organes comme les testicules, le cerveau, la rétine, les poumons, les reins ainsi que l'épithélium mammaire [212-214]. Elle est active avec les isomères tout-*trans* et 9-*cis* du rétinol, et suivant les espèces, parfois avec l'isomère 13-*cis* [211, 215, 216]. Mais il est à noter que l'isomère 13-*cis* de l'AR n'est pas un ligand pour les récepteurs à l'AR. En outre, elle semble fonctionner en aval d'ADH1 dans la synthèse d'AR à partir de rétinol [217, 218]. Une preuve de l'implication de RALDH1 dans la synthèse d'AR *in vivo* a été apportée par la suppression génétique du gène *Raldh1* chez la souris. Bien que les souris dépourvues de RALDH1 soient morphologiquement normales, parfaitement viables et fertiles, ces animaux présentent une faible capacité de synthèse d'AR dans le foie à l'âge adulte et l'œil pendant le développement, sites où RALDH1 est normalement exprimée [217, 219].

Le phénotype relativement léger observé lors de la suppression de RALDH1 est assez surprenant étant donné l'importance de l'AR dans le développement embryonnaire et le maintien de l'état différencié des épithéliums à l'âge adulte. Cela pourrait s'expliquer par l'existence d'autres RALDH qui compenseraient l'absence de RALDH1. Il semble qu'au moins chez la souris, la contribution de RALDH1 dans la synthèse d'AR pendant le développement embryonnaire soit relativement mineure. Un phénotype plus important a été observé chez les souris *Raldh1*<sup>-/-</sup> adultes. Ces animaux présentent en effet une forte résistance à l'obésité et au diabète de type II induit par la diète. De façon

frappante, elles possèdent très peu de tissu adipeux blanc [220], un tissu dans lequel RALDH1 est exprimée. Le modèle proposé par les auteurs de la publication relatant ces observations suggère qu'en l'absence de RALDH1, le rétinol s'accumulerait dans les précurseurs des adipocytes. Cela inhiberait leur différenciation via une voie de signalisation qui impliquerait le récepteur PPAR $\gamma$ , connu pour réguler l'adipogenèse. RALDH1 serait donc une cible thérapeutique potentielle dans plusieurs maladies métaboliques.

#### 3.2.2.4.2 RALDH1 un marqueur de cellules souches?

Récemment plusieurs laboratoires ont publié des résultats suggérant que RALDH1 serait un marqueur spécifique des cellules souches et des progéniteurs de plusieurs tissus comme les muscles [221], le cerveau (précurseurs des neurones) [222], la glande mammaire [214], la prostate [222], l'intestin et le tissu adipeux [223] ainsi que des cellules souches hématopoïétiques (CSH) [224, 225]. De fait, la détection de l'activité de RALDH1 a été utilisée avec succès pour l'isolation des cellules souches, notamment grâce au kit commercial aldefluor® (STEMCELL technologies, Vancouver). L'incubation des cellules à analyser avec un substrat spécifique permet de trier les cellules qui ont une activité ALDH par cytométrie en flux car elles deviennent fluorescentes. L'utilisation d'un inhibiteur de RALDH1, le DEAB [226], permet de s'assurer de la spécificité de la transformation du substrat par cette enzyme, donc que les cellules fluorescentes expriment bien RALDH1. De fait, la plupart des laboratoires attribuent l'activité aldefluor® des cellules souches à la présence de RALDH1. Un laboratoire a isolé en 2009 les précurseurs de plusieurs types cellulaires du mésoderme (ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules endothéliales) à partir de la moelle osseuse de patients. Ces cellules ont une forte activité aldefluor® [227]. Mais la fonction de RALDH1 dans les cellules souches et les progéniteurs n'est pas connue. Il a été proposé que la synthèse d'AR par RALDH1 pouvait induire la différenciation des CSH humaines. En effet, l'inhibition pharmacologique de RALDH1 par le DEAB induit l'expansion de

ces cellules et bloque leur différenciation, tandis que le traitement par l'AR reverse l'effet du DEAB [228]. Or chez la souris, la suppression de RALDH1 n'a pas d'effet sur les CSH, de plus, l'activité Aldefluor® des cellules hématopoïétiques des souris *Raldh1<sup>-/-</sup>* est toujours inhibée par le DEAB et son profil ne change pas, malgré l'absence de RALDH1 [229]. Cela suggère que RALDH1 n'est pas exprimée dans les CSH de la souris ou que d'autres ALDH pourraient compenser son absence. Cependant l'expression d'autres RALDH ou ALDH dans les CSH n'est pas caractérisée.

### 3.2.2.5 RALDH2

Après RALDH1, une autre enzyme, RALDH2, a été isolée. Son ADNc a été cloné à partir de testicules de rat [230]. Elle catalyse l'oxydation des isomères *9-cis*, *13-cis* et tout-*trans* du rétinol en AR *in vitro* [231]. Chez la souris, elle est exprimée dans de très nombreux tissus à l'âge adulte ou dans l'embryon, par exemple dans les somites [232], la prostate, les intestins, la rétine, le foie, les reins, les poumons, le cerveau et le coeur [233-237]. La suppression génétique de RALDH2 chez la souris est létale à un stade précoce du développement embryonnaire [233, 238]. Les embryons de souris *Raldh2<sup>-/-</sup>* subissent de nombreuses malformations, comme l'arrêt précoce du développement du cœur, causant la mort. Les embryons exhibent aussi une fermeture incomplète du tube neural, une réduction importante de la taille du tronc, une absence de rotation de l'axe antéropostérieur, ainsi que des défauts de développement des reins, de la rétine, des poumons, du cerveau et du pancréas [239-244]. L'essentiel des défauts de développement peut être aboli par l'administration d'AR à la mère pendant la grossesse ce qui suggère que RALDH2 joue un rôle dans la synthèse d'AR pendant le développement embryonnaire. En outre, la suppression de RALDH2 a permis de démontrer que cette enzyme est responsable de près de 80% de la production d'AR dans l'embryon [232]. L'AR détecté dans les embryons de souris *RALDH2<sup>-/-</sup>* a été attribué à la présence d'autres RALDH, notamment RALDH3. Il a aussi été suggéré que RALDH2 serait un suppresseur

de tumeur dans l'épithélium de la prostate humaine et que son expression serait un marqueur de bon pronostic dans le cancer de la prostate [245]. D'ailleurs le métabolisme de l'AR semble déficient dans un modèle murin de cancer de la prostate et il apparaît qu'un manque d'expression de RALDH2 dans la tumeur comparativement au tissu normal pourrait en être la cause [236].

### 3.2.2.6 RALDH3

RALDH3 a été la troisième enzyme de la famille à être identifiée, originellement dans la glande salivaire humaine [246]. Elle catalyse l'oxydation *in vitro* de l'isomère tout-*trans* du rétinol en AR. Son activité avec les autres isomères du rétinol n'est pas caractérisée [210, 247]. L'expression de RALDH3 dans des cellules en culture JEG-3 induit l'expression d'un gène rapporteur de l'AR. En outre, chez l'embryon de poulet, RALDH3 est exprimée dans l'épithélium neural du nez, de l'œil, de l'oreille, ainsi que dans plusieurs autres sites du système nerveux central et de la face [247]. L'expression de RALDH3 a été confirmée dans les mêmes régions chez l'embryon de souris. Les sites d'expression corrélaient avec ceux de l'expression du transgène LacZ exprimé sous la dépendance d'un promoteur minimal RARE régulé par l'AR [232], ce qui suggère que RALDH3 est aussi impliquée dans la synthèse d'AR pendant le développement embryonnaire. Cette hypothèse se vérifie chez la souris où sa suppression génétique entraîne la mort des foetus à la naissance en raison de malformations cranio-faciales entraînant une insuffisance respiratoire [248]. L'administration d'AR à la mère pendant la grossesse peut corriger dans une certaine mesure les défauts de développement observés. Ces données démontrent que RALDH3, comme RALDH2, joue un rôle important dans la synthèse d'AR pendant le développement embryonnaire.

Chez l'adulte, le rôle de RALDH3 est inconnu. Toutefois son expression a été détectée dans de nombreux tissus chez l'homme, notamment dans l'intestin, le foie, la prostate, le pancréas et les poumons [249]. Elle est aussi exprimée dans

les cellules de l'épithélium mammaire humain normal mais pas dans la lignée de carcinome mammaire MCF-7, qui ne synthétise pas l'AR [250, 251].

#### 3.2.2.7 RALDH4

RALDH4 est une autre enzyme de la famille des RALDH. Cette enzyme a été identifiée dans les reins chez le rat [252]. Chez l'homme et le rat, elle est surtout exprimée dans le foie et les reins et très peu dans les autres tissus [252]. Sa séquence est la plus divergente, elle ne présente que près de 50% d'identité avec les autres enzymes de la famille. Elle est en outre la seule RALDH à n'être active qu'avec l'isomère *9-cis* du rétinol, mais pas avec l'isomère tout-*trans* [253]. Cela suggère qu'elle n'est pas impliquée dans la synthèse d'AR tout-*trans* mais qu'elle pourrait être impliquée dans une possible voie de synthèse d'AR *9-cis*. Toutefois son rôle reste inconnu en raison du manque d'études à son sujet.

Jusqu'ici trois enzymes de la famille des RALDH ont un rôle avéré dans la voie de synthèse de l'AR *in vivo*. Hormis pour RALDH1, les fonctions de ces enzymes à l'âge adulte ne sont pas connues car les souris dépourvues de RALDH2 ou de RALDH3 ne sont pas viables. Cela explique que les rôles respectifs de chacune des RALDH dans la synthèse d'AR à l'âge adulte soient peu caractérisés, notamment dans les tissus épithéliaux dont la différenciation dépend de l'AR et où elles sont exprimées.

### 3.3 Le catabolisme de l'AR

La régulation des niveaux d'AR dans les cellules cible met en œuvre non seulement sa biosynthèse mais aussi son inactivation par catabolisme. Plusieurs enzymes du cytochrome sont impliquées dans cette voie. Il est généralement proposé que les enzymes CYP26, soit CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1 sont les enzymes les plus importantes, possiblement avec une contribution (mineure) de CYP3A et CYP2C [254]. L'AR est le substrat des CYP26, découvertes par

notamment M. Petkovitch, qui produisent plusieurs métabolites polaires de l'AR, mais surtout le 4-hydroxy-AR, leur produit principal [255-259]. Nous avons vu que la carence en vitamine A aussi bien que la surdose d'AR ont des effets tératogènes marqués. Les enzymes CYP26 sont donc considérées comme des régulateurs importants de l'homéostasie de l'AR dans les cellules cibles, notamment pendant le développement [260-262].

## **4. La glande mammaire**

Après cette description des voies de synthèse et de signalisation de l'AR, nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement au tissu épithélial de la glande mammaire, l'objet d'étude de cette thèse. Après une présentation de l'anatomie et de la physiologie de la glande mammaire normale, nous explorerons plus en détail ce qui est connu à propos de la signalisation et de la synthèse de l'AR et de leurs rôles dans l'épithélium mammaire. Nous verrons ensuite les liens entre l'AR et le cancer du sein.

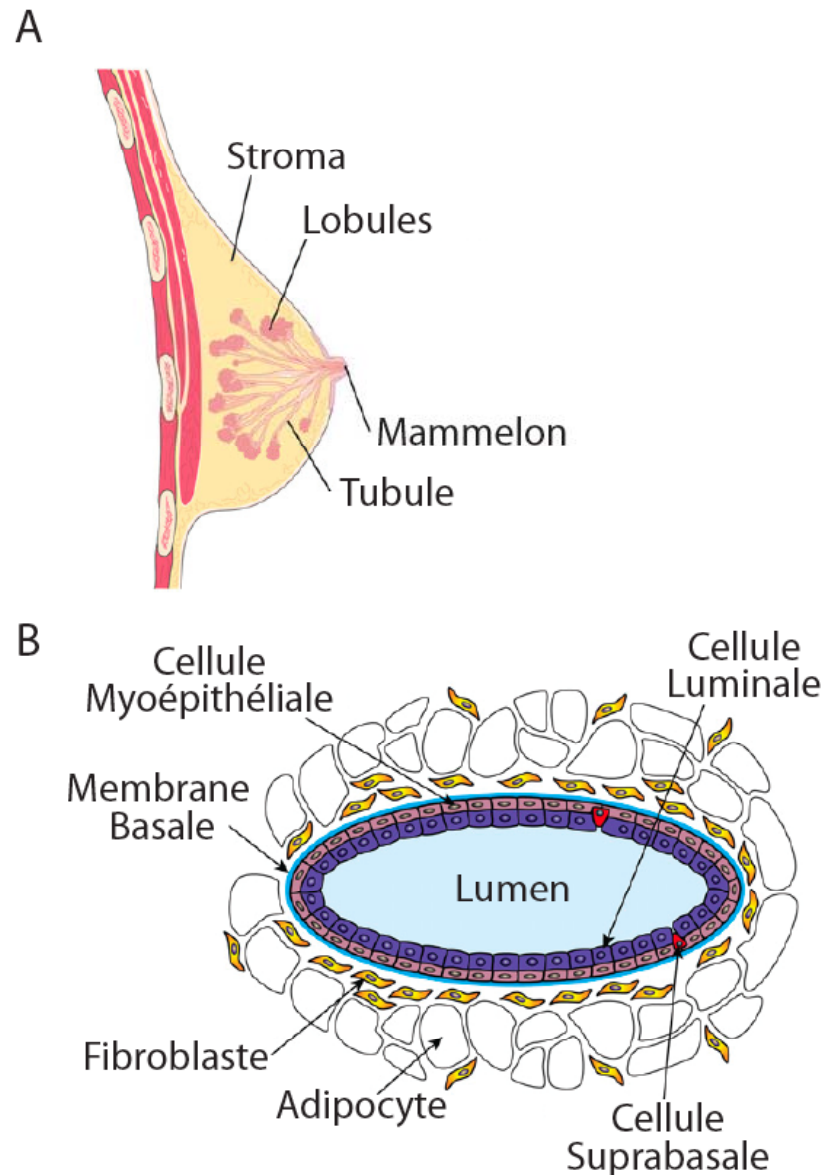
### 4.1 Description anatomique

La fonction principale de la glande mammaire est la production de lait lors de l'allaitement. Chez l'adulte, l'essentiel de la masse de la glande mammaire est constitué d'une matrice de stroma (d'origine mésodermique) qui est parcourue par une arborescence de tubules creux et de lobules terminaux dont les parois sont constituées de tissu épithélial dérivé de l'ectoderme (Figure 6A). Les cellules de l'épithélium mammaire ont pour fonction de sécréter le lait qui est canalisé dans les tubules jusqu'au mamelon où il est excrété.

#### 4.1.1 Le stroma

Le stroma est aussi appelé coussinet adipeux. Il compose, chez l'homme, l'essentiel de la masse de la glande mammaire. Il s'agit surtout d'un tissu gras,

donc constitué d'adipocytes, mais aussi de tissu conjonctif, qui comprend des fibroblastes et plusieurs protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I et de type IV, la fibronectine et la laminine [263] (Figure 6). Le tissu stromal est considéré comme étant un tissu de soutien physique pour l'épithélium. Mais il semble aussi avoir un rôle dans le contrôle de son développement et de sa morphologie [263, 265-268]. Les cellules du stroma sécrètent des facteurs qui induisent la prolifération de cellules épithéliales *in vitro* [269]. Il peut aussi influencer, voire reprogrammer, la différenciation de cellules souches d'autres organes [270]. En effet, et de façon surprenante, l'injection dans le stroma mammaire de cellules souches neurales ou hématopoïétiques ainsi que de cellules souches issues des tubes séminifères des testicules induit leur différenciation en cellules épithéliales mammaires (de type basal et luminal). Celles-ci sont capables de coloniser le stroma et de participer à la formation des tubules et des lobules. Malgré leur origine non mammaire, elles expriment bel et bien des marqueurs de cellules mammaires, comme la  $\beta$ -caséine (protéine du lait) et le récepteur aux estrogènes ER $\alpha$ . Cela renforce l'idée selon laquelle le stroma influence profondément le devenir des cellules épithéliales [263, 271-273]. L'épithélium aurait lui aussi une influence sur la physiologie du stroma [274]. Toutefois les interactions et influences réciproques entre l'épithélium et le stroma mammaire sont assez mal connues. Le stroma contient des cellules du système immunitaire (macrophages, éosinophiles) qui pourraient aussi avoir un rôle dans la communication avec le tissu épithélial [275, 276].



**Figure 6**

Schéma de la glande mammaire humaine.

(A) Vue en coupe transversale d'une glande mammaire humaine montrant l'arborescence de tubules et de lobules épithéliaux qui parcourent le stroma. (B) Coupe transversale montrant le stroma qui entoure les deux couches de cellules constituant un tubule mammaire caractéristique. Adapté de [264].



#### 4.1.2 L'épithélium mammaire

L'épithélium mammaire est organisé en un réseau creux de tubules branchés et de lobules terminaux qui sécrètent le lait. Il est stratifié et comprend essentiellement deux compartiments, la couche basale et la couche luminale, que l'on peut observer au microscope sur des coupes de glandes mammaires (voir schémas Figure 6). Chez l'homme, l'épithélium ne représente qu'une faible proportion du total de la masse de la glande mammaire. Il est séparé physiquement du stroma par la membrane basale, un tissu conjonctif composé essentiellement de collagène mais aussi de laminine ainsi que de nombreuses autres protéines en proportions moindres [277]. Les cellules des différents compartiments de l'épithélium mammaire sont classiquement distinguées par la détection par immunohistochimie de marqueurs exprimés spécifiquement dans chacun de ces compartiments.

##### 4.1.2.1 Le compartiment basal

La couche basale regroupe toutes les cellules de l'épithélium qui ne sont pas au contact du lumen [278]. Elles sont adossées à la membrane basale [279]. Dans ce compartiment, on trouve essentiellement des cellules myoépithéliales différenciées mais aussi les cellules souches mammaires ainsi que des progéniteurs des lignées myoépithéliales et luminales plus ou moins engagés dans une voie de différenciation donnée [264]. Les progéniteurs et cellules souches seraient situées en position basale ou suprabasale, c'est-à-dire dans une position intermédiaire entre la couche basale et la couche luminale [280-282].

Les cellules myoépithéliales, qui ont une forme allongée, ont des propriétés contractiles et sont impliquées dans l'éjection du lait lors de l'allaitement [279, 283]. Elles participent à la formation de la membrane basale et y sont attachées par des héli-desmosomes. Elles sont aussi attachées aux cellules de la couche luminale adjacente par des desmosomes [278, 284]. Elles expriment plusieurs

marqueurs qui leur sont spécifiques et qui ne sont pas trouvés dans les cellules de la couche luminale, comme l'actine du muscle lisse (SMA), les cytokératines 5 et 14, les intégrines  $\beta 4$  et  $\alpha 6$  ainsi que le facteur de transcription p63 [285, 286].

#### 4.1.2.2 Le compartiment luminal

Le compartiment luminal est constitué d'une monocouche de cellules hautement polarisées et très différenciées, de forme cuboïde et fortement associées entre elles latéralement par des jonctions serrées. Ces cellules sont au contact de la lumière des tubules et des lobules d'un côté et des cellules du compartiment basal de l'autre. Leur fonction principale est la sécrétion de lait, surtout au niveau des lobules terminaux. Elles expriment des marqueurs qui leur sont spécifiques et qui ne sont pas exprimés dans les cellules myoépithéliales comme la cytokératine 8/18 et les facteurs de transcription GATA-3 et FOXA1 [286-288]. Les hormones stéroïdiennes ont une influence sur le développement et la fonction de la glande mammaire, d'ailleurs, 15 à 30% des cellules de type luminal expriment le récepteur des estrogènes  $ER\alpha$  et de la progestérone PR. Il est important de noter que, contrairement aux cellules lumineales, les cellules de la couche basale n'expriment pas  $ER\alpha$  et PR [289]. De plus, il existe au moins deux sous-types de cellules lumineales, les cellules situées dans les tubules et celles qui composent les lobules terminaux [281, 287]. Certains auteurs ont avancé que des progéniteurs bipotents des lignées lumineales et myoépithéliales se trouvaient aussi dans la couche luminale (en plus de la couche basale) [290].

## 4.2 Hiérarchie cellulaire dans l'épithélium mammaire

L'existence de plusieurs types cellulaires différents dans la glande mammaire a conduit certains auteurs à proposer un modèle d'organisation hiérarchique des cellules de ce tissu. Jusqu'à très récemment, les différents tissus de l'organisme étaient considérés comme étant des assemblages relativement stables et peu dynamiques d'un ou de plusieurs types cellulaires en différenciation terminale.

Ce modèle a tout d'abord été mis en cause dans le compartiment hématopoïétique. En effet, un grand nombre d'études, notamment les travaux précurseurs de J.E. Till et E.A. McCulloch, ont démontré entre la fin des années 1960 et le début des années 2000 qu'il existe une organisation hiérarchique parmi les cellules hématopoïétiques [291-293]. De nombreuses sous-populations de cellules furent identifiées sur la base de la détection d'un ou de plusieurs marqueurs de surface. Le concept de hiérarchie a été proposé pour rendre compte de cette complexité. Il postule l'existence de certains liens de parenté entre les sous-populations de cellules d'un tissu. Les cellules souches sont au sommet de la hiérarchie et donneraient constamment naissance à des progéniteurs intermédiaires multipotents qui peuvent s'engager dans plusieurs voies de différenciation, phénomène qui se déroule de façon séquentielle et unidirectionnelle. À chaque étape, les progéniteurs perdent une partie de leur potentiel de différenciation, tout en acquérant simultanément un phénotype de plus en plus différencié. Dans le compartiment hématopoïétique, ce processus est qualifié d'hématopoïèse (génération dynamique des différents types et lignages cellulaires de ce tissu) [293, 294]. Un tel modèle d'organisation hiérarchique a ensuite été proposé pour plusieurs tissus épithéliaux comme la peau et l'intestin [295] ainsi que l'épithélium de la glande mammaire, notre sujet d'étude [264, 296, 297]. Certains auteurs utilisent même le terme de « mammopoïèse » pour qualifier les processus de formation des diverses populations de cellules de la glande mammaire, par analogie avec l'hématopoïèse [295].

#### 4.2.1 Le modèle d'organisation hiérarchique de l'épithélium mammaire

##### 4.2.1.1 Mise en évidence et isolation des cellules souches mammaires

Ce modèle implique l'existence de cellules souches mammaires (CSM) tout au sommet de la hiérarchie. Leur existence était déjà suspectée en raison de

la capacité de la glande mammaire à subir de nombreux cycles consécutifs d'expansion (lors de la grossesse et de l'allaitement) et de régression (lors de l'involution). Cette propriété était attribuée à la présence de cellules souches [298, 299]. Leur existence fut démontrée de façon originale par K.B. DeOme en 1959 grâce à une nouvelle technique (inventée par lui) de transplantation de cellules de l'épithélium mammaire d'une souris dans l'un des coussinets adipeux d'une autre souris préalablement débarrassé chirurgicalement de son propre tissu épithélial. K.B. DeOme montra que la transplantation d'un fragment d'épithélium, même minuscule, permettait la reconstitution d'une nouvelle glande mammaire anatomiquement complète, incluant tous les types cellulaires attendus. En outre, cette propriété est maintenue dans la glande mammaire nouvellement formée, comme cela fût démontré par des expériences de transplantations en série [300, 301]. Cela suggère que l'épithélium mammaire contient des précurseurs qui peuvent se maintenir après plusieurs transplantations et générer les différents types cellulaires d'une glande mammaire normale. Il s'agit donc de CSM. Il restait cependant à les détecter directement et à les isoler. Elles sont très rares, et de grands efforts ont été déployés, afin de les purifier à partir de cultures primaires de cellules mammaire humaines et de souris. Une stratégie similaire à celle qui est classiquement mise en œuvre pour la purification et l'étude des cellules du système hématopoïétique a été utilisée. Elle consiste à un marquage par immunofluorescence des cellules en suspension avec un ou plusieurs anticorps dirigés contre certaines protéines exprimées à la surface de la membrane plasmique, suivi par un tri par cytométrie en flux [286]. Cette technique a permis à plusieurs auteurs de montrer qu'une sous-population de cellules mammaires exprimant un faible niveau du marqueur de surface CD24 (un marqueur utilisé pour isoler les cellules souches neuronales [302] et qui semble associé à la tumorigenèse dans le tissu mammaire [303]) ainsi qu'un haut niveau de CD29 ou de CD49f (aussi nommé intégrine alpha-6, un marqueur de surface associé à la progression tumorale dans le sein [304]) était enrichie en cellules souches [296, 305].

Une avancée majeure a été la démonstration chez la souris que l'injection d'une seule de ces cellules dans un coussinet adipeux permettait la reconstitution d'une nouvelle glande mammaire complète et fonctionnelle [305, 306]. K.E. Sleeman et ses collègues ont ensuite montré que les cellules souches mammaires sont situées dans la couche basale. La couche luminale ne semblerait pas en contenir [281].

#### 4.2.1.2 Potentiel de différenciation des cellules souches mammaires

Les CSM peuvent se différencier en une variété de lignées épithéliales. Par exemple, elles peuvent se différencier en progéniteurs de cellules lobulaires et tubulaires [307], ainsi qu'en cellules différenciées des lignées myoépithéliales et luminales [307-309]. Des profils d'expression génétique de ces différentes sous-populations de cellules (cellules souches, progéniteurs, cellules différenciées) ont été publiés par la suite [307, 308, 310]. Grâce à ces résultats, l'isolation des différentes sous-populations de cellules de l'épithélium mammaire est possible dans une certaine mesure, par exemple, les progéniteurs bipotents et les progéniteurs de la lignée luminale sont isolés grâce à l'expression de EPCAM (Epithelial cell adhesion molecule), un antigène exprimé à la membrane. La détection combinée de plusieurs marqueurs permet ensuite l'isolation de sous-populations plus différenciées. Ces marqueurs sont des protéines membranaires accessibles à une détection par l'utilisation d'anticorps spécifiques sur les cellules vivantes telles que MUC1 (mucin-1 aussi appelée PEM : polymorphic epithelial mucin), THY1 (thymocyte antigen 1, aussi nommé CD90), CD133 (prominin-1 chez la souris), CD10 (une metalloendopeptidase membranaire aussi nommée CALLA) ainsi que CD49f (aussi nommée alpha integrin 6, il s'agit d'une protéine d'adhésion). Les cellules de la lignée luminale sont identifiées selon la combinaison  $(MUC1/CD133)^+CD10^-THY1^-CD49f^+$  tandis que les cellules myoépithéliales sont distinguées selon la combinaison  $(MUC1/CD133)^-CD10^+THY1^+CD49f$  [310].

#### 4.2.1.3 Différenciation des cellules souches mammaires

Toutefois on comprend encore assez mal ce qui détermine et déclenche la différenciation des cellules souches mammaires vers un type myoépithélial ou bien luminal. Deux hypothèses existent, le modèle stochastique postule que chaque cellule souche peut se différencier au hasard de façon autonome, tandis que selon une autre hypothèse, le microenvironnement de la cellule souche contrôle de façon stricte sa différenciation. Bien que le mécanisme exact reste activement discuté, il a été montré de façon élégante par M.A. LaBarge et ses collaborateurs en 2009, que la détermination du chemin qui sera suivi lors de la différenciation n'est pas aléatoire mais dépend fortement d'un grand nombre de signaux présent dans le micro-environnement, ou niche, de la CSM [311]. Ces nombreux signaux de nature chimique (endocrine ou paracrine) ou physique (interactions avec la matrice extracellulaire via des intégrines [312]) semblent intégrés de façon combinatoire par la cellule souche elle-même, ce qui déciderait de la voie de différenciation qui sera suivie. Cela suggère l'existence d'une régulation fine et complexe du destin des CSM.

Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme étant impliquées dans la différenciation des CSM. Par exemple des publications récentes suggèrent que les hormones stéroïdiennes, notamment la progestérone, possiblement en synergie avec les estrogènes, pourraient agir en induisant l'autorenouveaulement des CSM [313]. Il semble que p53 contrôle chez les CSM le processus de détermination du « choix » d'effectuer un autorenouveaulement par une division symétrique ou de s'engager sur une voie de différenciation par une division asymétrique [314, 315]. La protéine de la famille polycomb Bmi-1 semble, elle, impliquée dans l'autorenouveaulement des CSM (via la voie de signalisation Hedgehog) [316]. La voie de signalisation Notch et les facteurs de transcription GATA-3 et FOXA1 pourraient quant à eux jouer un rôle important dans la détermination du destin luminal des progéniteurs bipotents [288, 317],

tandis que plusieurs études indiquent que GATA-3 est aussi impliqué dans la différenciation terminale des progéniteurs luminaux [318]. Enfin, le facteur de transcription p63 semble être important pour la différenciation en des cellules myoépithéliales [286].

### 4.3 Développement de la glande mammaire

La glande mammaire est un tissu hautement dynamique, c'est l'un des rares organes dont le développement se poursuit après la naissance. Il est fortement influencé par plusieurs hormones parmi lesquelles les estrogènes et la progestérone. Plusieurs résultats indiquent que l'AR pourrait aussi y jouer un rôle important.

Le développement de la glande mammaire commence *in utero* par la formation de placodes épithéliales (épaississement de l'épithélium) le long de deux bandes longitudinales de l'ectoderme ventral. Le nombre de ces placodes varie en fonction de l'espèce. Puis l'ectoderme des placodes s'invagine dans le mésoderme sous-jacent [319]. Un début d'arborescence des tubules se développe ensuite au contact d'une ébauche embryonnaire du coussinet adipeux issu du mésoderme [320]. Le développement ne va pas plus loin chez l'embryon et chez l'individu prépubère. La glande mammaire se développe de façon isométrique pendant l'enfance, jusqu'à la puberté où les hormones sexuelles déclenchent un développement allométrique. Il aboutit à la formation d'une glande mammaire mature composée d'un réseau étendu de tubules branchés et de lobules.

Plusieurs hormones sexuelles contrôlent la formation de la glande mammaire, notamment le développement des tubules épithéliaux pendant lequel les cellules de l'épithélium prolifèrent, colonisent le stroma et se différencient. Les estrogènes et la progestérone, hormones sexuelles produites par les ovaires, sont les plus importantes dans ce processus [321].

## 4.3.1 Hormones stéroïdiennes et développement de la glande mammaire

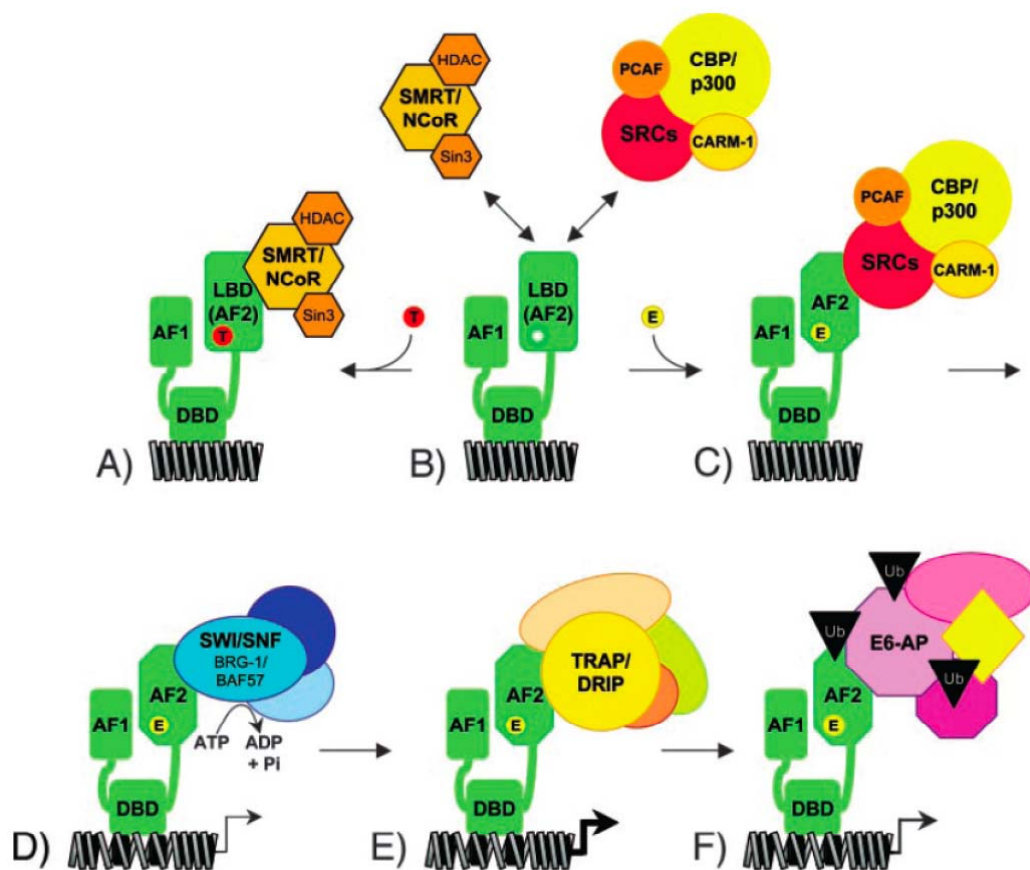
**Figure 7**

Schéma simplifié des mécanismes d'activation/répression de la transcription de l'expression de gènes cibles par ER $\alpha$ .

La liaison d'antiestrogènes comme le tamoxifène au récepteur apo-ER $\alpha$  (B) induit (ou renforce) le recrutement de corepresseurs de la transcription par ER $\alpha$  (A). La liaison de l'E2 par ER $\alpha$  induit le recrutement de complexes de coactivateurs (C), notamment les p160 qui permettent l'établissement d'un complexe de remodelage de la chromatine incluant CBP/p300, pCAF (à activité histone acétyl-transférase) et CARM-1 (à activité histone méthyl-transférase). Ces complexes agissent de façon combinatoire afin d'optimiser la transactivation d'ER $\alpha$ , notamment SWI/SNF (D) et TRAP/DRIP (E) (Adapté de [322]).



#### 4.3.1.1 Signalisation par les estrogènes: le récepteur nucléaire ER $\alpha$

Le récepteur des estrogènes ER $\alpha$  est une protéine de la famille des récepteurs nucléaires, c'est un facteur de transcription ligand-inductible dont le ligand est le 17- $\beta$ -estradiol ou E2 (voir 4.3.1.2), toutefois il peut lier d'autres estrogènes comme l'estrone (mais avec beaucoup moins d'affinité que l'E2). Comme toutes les protéines de cette famille ER $\alpha$  a une structure modulaire très similaire à celle des récepteurs à l'AR (voir figure 2) avec un domaine de liaison de l'ADN (DBD) et deux domaines AF-1 (ligand-indépendant) et AF-2 (ligand-dépendant : domaine de liaison du ligand ou LBD) [45, 46, 323]. Selon le paradigme actuel, et contrairement aux récepteurs de l'AR, ER $\alpha$  est essentiellement localisé dans le cytosol en l'absence de son ligand E2, ou il est associé à un complexe protéique composé notamment de protéines de choc thermique (hsp-90 et hsp-70) [324-326] et de l'immunophiline (p59) [327, 328] ainsi que de p23 [329]. La liaison de l'E2 à ER $\alpha$  induirait un changement de conformation du récepteur puis son homodimerisation, suivie de la translocation dans le noyau cellulaire où les homodimères d'ER $\alpha$  peuvent se lier à l'ADN selon différentes modalités que nous allons détailler plus loin, et ainsi moduler l'expression de nombreux gènes [330].

Des expériences d'analyse de transcriptome par biopuce d'ADN (*DNA microarray*) et de ChiP ou de ChiP-on-Chip ont montré que les dimères d'ER $\alpha$  pouvaient lier l'ADN directement au niveau de séquences conservées du type PuGGTCA répétées deux fois de façon palindromique et espacées de trois paires de bases (dont la nature est variable) [331, 332]. Les dimères d'ER $\alpha$  peuvent aussi être recrutés à la chromatine indirectement, via les facteurs de transcription SP-1 (*specificity protein 1*, facteur de transcription à doigt de zinc qui lie certaines séquences riches en GC) [333, 334] et AP-1 (*Activator Protein-1*, un facteur de transcription à domaine *leucin zipper* hétérodimérique composé de c-jun et de c-fos) [335, 336]. Le recrutement direct ou indirect d'ER $\alpha$  à la

chromatine permet la modulation directe de l'expression de gènes cibles de l'E2, dite voie génomique, tandis que il existe une voie non-génomique médiée semble-t-il par ER $\alpha$  qui serait localisé à la membrane. Nous n'aborderons pas ici la voie non-génomique en détail (voir [337]).

La voie génomique implique la liaison des homodimères d'ER $\alpha$  à l'ADN (directement ou indirectement) sous l'effet de la liaison de l'E2 puis le recrutement de complexes d'effecteurs divers (Figure 7) parmi lesquels les coactivateurs de la transcription p160, CBP/p300, pCAF (à activité histone acétyl-transférase) et CARM-1 (à activité histone méthyl-transférase). Ces complexes recrutent aussi des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants SWI/SNF et TRAP/DRIP qui agissent de façon concertée afin d'augmenter le niveau de transcription des gènes cibles de l'E2 [322, 337]. Dans certains contextes cellulaires et en fonction du gène cible considéré, la répression active de la transcription de gènes cibles est aussi possible via le recrutement par ER $\alpha$  de corépresseurs de façon ligands-dépendante comme LCoR ou RIP140 [111, 338].

En plus des estrogènes qui sont des ligands naturels de ER $\alpha$ , des composés de synthèse ont été développés afin de moduler pharmacologiquement l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$ . Ces composés ont été baptisés antiestrogènes, ou plus précisément SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*). Ils sont aujourd'hui couramment utilisés pour le traitement de cancers comme le cancer du sein (tumeurs hormono-dépendantes) [339]. Il existe deux types d'antiestrogènes, les antiestrogènes totaux comme l'ICI182,780 (fulvestran) et les antiestrogènes partiels comme le tamoxifène. Il a été montré que le fulvestran induit l'association de ER $\alpha$  avec la matrice nucléaire, ce qui interfère avec sa liaison à l'ADN, puis augmente sa dégradation par la voie du protéasome [340, 341], ce qui diminue de fait la présence de ER $\alpha$  dans la cellule et nuit à sa fonction comme facteur de transcription. Selon le modèle aujourd'hui proposé, les antiestrogènes partiels comme le tamoxifène n'induiraient pas

l'association de ER $\alpha$  avec la matrice extracellulaire, mais permettraient plutôt le recrutement par ER $\alpha$  de corepresseurs de la transcription comme NCoR et SMRT [342].

#### 4.3.1.2 Les estrogènes et le développement de la glande mammaire

Les estrogènes sont sécrétés par les ovaires à partir de la puberté et ensuite durant toute la vie jusqu'à la ménopause, en réponse à l'augmentation du niveau de gonadotrophines dans le sang [343]. Ce sont les hormones les plus importantes dans le développement et la morphogenèse de la glande mammaire. En effet, chez la souris, l'ovariectomie (qui entraîne une déplétion des estrogènes dans le sang) supprime totalement le développement des tubules mammaires à la puberté [344]. L'administration d'estrogènes aux souris ovariectomisées restaure la formation d'une glande mammaire normale [345].

Les estrogènes agissent sur les tissus cibles par l'intermédiaire du récepteur nucléaire ER $\alpha$ . On l'a vu, c'est est un facteur de transcription induit par son ligand le 17- $\beta$ -estradiol (ou E<sub>2</sub>). Il est exprimé dans 15 à 30% des cellules du compartiment luminal [289], mais pas dans les cellules de la couche basale. C. Brisken et ses collaborateurs ont montré en 2006, chez la souris, que la suppression génétique de ER $\alpha$  supprime le développement de la glande mammaire [344]. ER $\alpha$  est donc requis pour le développement de la glande mammaire ce qui est en très bon accord avec les données obtenues avec les souris ovariectomisées. La suppression d'ER $\alpha$  cause une déficience totale du développement des tubules en raison d'un défaut de prolifération des cellules de l'épithélium. Par contre la différenciation de ces cellules est peu ou pas affectée par la suppression d'ER $\alpha$  car l'expression de gènes marqueurs de différenciation, comme l' $\alpha$ -caséine et l' $\alpha$ -lactalbumine, ne semble pas modifiée [344].

#### 4.3.1.3 Mécanismes d'action des estrogènes dans l'épithélium mammaire

Le mécanisme par lequel les estrogènes induisent la prolifération des cellules de l'épithélium mammaire normal est activement discuté. En effet, il a été montré que des cellules mammaires épithéliales issues de souris  $ER\alpha^{-/-}$  implantées dans le coussinet adipeux de souris normales ne forment pas une nouvelle glande mammaire contrairement aux cellules mammaires provenant de souris normales. Par contre leur co-transplantation avec une petite proportion de cellules épithéliales qui expriment  $ER\alpha$  induit la formation d'une nouvelle glande mammaire, mosaïque de cellules exprimant  $ER\alpha$  et de cellules  $ER\alpha^{-/-}$  [344]. Cela indique que les cellules mammaires  $ER\alpha^{-/-}$  ont toujours la capacité de proliférer et de former une glande mammaire, mais que la présence à leurs côtés de cellules épithéliales qui expriment  $ER\alpha$  est nécessaire pour cela. De façon paradoxale, et en accord avec ces derniers résultats, il semblerait que les cellules qui expriment  $ER\alpha$  ne soient pas des cellules en prolifération active dans la glande mammaire [346]. En outre, plusieurs auteurs ont montré que les cellules en prolifération sont presque toujours adjacentes aux cellules qui expriment  $ER\alpha$  [289, 344].

Deux modèles ont donc été proposés pour décrire l'action des estrogènes dans la glande mammaire. Le premier postule que le schéma d'expression de  $ER\alpha$  est relativement figé et que les cellules qui expriment  $ER\alpha$  activent la prolifération des cellules  $ER\alpha$ -négatives qui leur sont adjacentes via une signalisation paracrine. Selon ce modèle, les cellules  $ER\alpha$ -positives et  $ER\alpha$ -négatives représenteraient deux populations distinctes et figées de cellules en différenciation terminale. Le second que les mêmes cellules oscillent entre un état  $ER\alpha$ -positif non-prolifératif et un état  $ER\alpha$ -négatif prolifératif. Ce second modèle est appuyé par le fait que le traitement de souris par des estrogènes induit la prolifération des cellules luminales et diminue simultanément le nombre de

cellules qui expriment ER $\alpha$  [347]. D'autres auteurs privilégient un contrôle de la prolifération des cellules mammaires de façon indirecte via la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules ER $\alpha$ -positives [346, 348-352]. Ces données suggèrent que le contrôle et le développement de la glande mammaire mettent en jeu des interactions complexes entre les hormones stéroïdiennes et des facteurs de croissance sécrétés par les cellules épithéliales. Il est possible que les deux modèles mentionnés coexistent.

#### 4.3.1.4 Le récepteur ER $\beta$

Un autre récepteur des estrogènes existe, ER $\beta$ , sa séquence est très proche de celle d'ER $\alpha$ , mais sa fonction dans la glande mammaire n'est pas claire. Son schéma d'expression (exclusivement luminal) est distinct de celui de ER $\alpha$ , mais le recoupe partiellement. Plusieurs résultats semblent indiquer qu'il pourrait interagir avec ER $\alpha$  et moduler négativement son action [353]. La suppression génétique de ER $\beta$  chez la souris n'a aucun effet sur le développement de la glande mammaire [354]. Son rôle potentiel dans la glande mammaire demeure donc encore assez nébuleux.

#### 4.3.1.5 La progestérone

La progestérone est le ligand de deux membres de la famille des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription ligand-inductibles, PRA et PRB. Il semble que seul PRB soit en mesure de médier les effets de la progestérone dans la glande mammaire de souris [355], mais ce fait est encore discuté. Les récepteurs de la progestérone sont exprimés uniquement dans la couche luminale. De plus, les cellules qui expriment PRA et PRB expriment aussi ER $\alpha$ . [289]. Il semble que la suppression de PRB chez la souris empêche la formation des lobules mammaires, mais cela reste à confirmer [356]. En tout état de cause, la compréhension du rôle de la progestérone dans la glande mammaire semble jusqu'ici assez limitée.

#### 4.3.2 Rôle de l'AR dans le développement de la glande mammaire

Comparativement aux hormones stéroïdiennes, les effets et les rôles de l'AR dans la glande mammaire sont beaucoup moins bien caractérisés et en tout cas relativement mal compris. La pertinence de l'étude du rôle de l'AR dans l'épithélium mammaire vient du fait que plusieurs protéines impliquées dans sa synthèse où sa voie de signalisation y sont exprimées, comme CRBPI, CRABPII, les trois isotypes RAR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , RXR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , RALDH1 et RALDH3 ainsi que CYP26A1 [214, 250, 357-360].

Chez la souris, la carence en vitamine A cause un retard de développement de la glande mammaire avec une forte diminution du nombre de tubule et de lobules comparativement aux souris non carencées [13]. Chez le rat, la déficience en vitamine A induit une diminution de la taille des glandes mammaires [361]. Pourtant il n'y a pas d'effets répertoriés de la suppression génétique d'un ou de plusieurs récepteurs de l'AR sur la morphologie de la glande mammaire, possiblement en raison de redondances fonctionnelles entre les isotypes de RAR, qui y sont tous exprimés. Chez la souris, l'expression transgénique d'un dominant négatif de RAR, susceptible de bloquer la signalisation de tous les isotypes de RAR dans la glande mammaire induit une forte augmentation du nombre de branchements des tubules [362]. Ces résultats semblent indiquer que l'AR aurait un rôle dans la morphogenèse de la glande mammaire, mais qui reste à déterminer.

L'AR aurait peut-être un rôle dans l'involution, soit la régression de la glande mammaire après l'arrêt de la lactation car juste après le sevrage, les expressions de CRBPI, CRABPII mais surtout de RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  et de RXR $\alpha$  augmentent fortement dans l'épithélium. Toutefois le mécanisme sous-jacent n'est pas tout à fait clair. Il pourrait mettre en jeu le remodelage de la matrice extracellulaire de la glande mammaire car après le sevrage l'expression de

plusieurs métallo-protéases augmente fortement dans l'épithélium, probablement sous l'effet direct de l'AR [358]. Comme on le voit, la fonction exacte de l'AR dans la glande mammaire n'est pas connue bien que plusieurs résultats démontrent clairement qu'il y joue un rôle. Mais jusqu'ici, l'essentiel des résultats disponibles dans la littérature a été obtenu *in vitro* grâce à des modèles de cellules en culture.

### 4.3.3 L'AR et les cellules en culture

#### 4.3.3.1 Modèles de cellules cultivées en 3 dimensions

Plusieurs auteurs ont cherché depuis les années 1970 à développer des modèles de culture de cellules mammaires *in vitro* en 3 dimensions dans des matrices constituées d'un gel contenant du collagène ou des protéines de matrice extracellulaire purifiée (matrigel). En effet, les cellules mammaires cultivées sur une matrice de collagène pouvaient se différencier et former des mammosphères, c'est-à-dire des sphères constituées d'une monocouche de cellules polarisées entourant un lumen, voire des tubules creux branchés, qui miment les structures que forment les cellules épithéliales lorsqu'elles colonisent le stroma mammaire [363-365]. Ces modèles complètent avantageusement les études *in vivo*, car ils sont plus simples à mettre en oeuvre et ils permettent d'étudier les divers facteurs qui affectent la morphogenèse des cellules mammaires dans des conditions contrôlées, qui se rapprochent autant que possible des conditions auxquelles ces cellules sont soumises *in vivo*. Cette méthode présente, bien entendu, des biais inhérents aux conditions expérimentales choisies, comme l'apparition d'une polarité inversée des cellules qui constituent les tubules [290]. Elle a toutefois permis de montrer que divers signaux influencent la morphologie des tubules et la différenciation des cellules mammaires. Il a par exemple été montré que le TGF $\beta$ -1 induisait la formation de tubules creux et branchés par les cellules mammaires J3B1 cultivées dans une matrice de collagène de type I [366] tandis que le facteur de croissance hépatique (HGF) provoque la formation de tubules

par les cellules mammaires de souris [367]. Le traitement par diverses hormones des mêmes cellules induit leur différenciation et même la sécrétion de micelles de  $\beta$ -caséine et de gouttelettes de lipides dans le lumen des tubules et des lobules, signe d'une différenciation lactogénique (cellules sécrétrices de lait) [368]. En utilisant ce type de modèles plusieurs auteurs ont obtenu des résultats suggérant que l'AR peut influencer la morphologie des structures formées par les cellules mammaires.

#### 4.3.3.2 Effet de l'AR sur les cellules cultivées en trois dimensions

L'AR induit la différenciation des cellules mammaires humaines MCF10A, notamment leur polarisation lorsqu'elles sont cultivées sur matrigel. Dans ces conditions, elles forment des sphères constituées d'une monocouche de cellules entourant un lumen [369]. L'AR a le même effet sur les cellules mammaires humaines (HMEC) cultivées sur une matrice de collagène de type I. Dans ce cas, l'expression d'un dominant négatif des RAR supprime l'apparition du lumen, les cellules HMEC forment plutôt des colonies de cellules indifférenciées et non-polarisées [370]. Les cellules mammaires de souris J3B1A forment des tubules branchés lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène de type I, et l'AR induit la formation d'un lumen dans ces tubules. De façon intéressante, ce phénomène semble mettre en jeu la synthèse d'AR car le rétinol a le même effet que l'AR [371]. L'AR, en synergie avec l'héréguline (un ligand du récepteur membranaire c-Erb) provoque aussi la formation de branchements dans les tubules formés *in vitro* par les cellules mammaires HMEC et MTSV1-7 ainsi que par les cellules de carcinome mammaire T47D et SKBR3 [372]. Ces données suggèrent que l'AR peut induire la différenciation des cellules mammaires cultivées sur une matrice de collagène ou de matrigel et moduler la morphologie des structures formées par ces cellules. En plus de ces résultats, de nombreuses études ont été publiées sur les effets de l'AR sur des cellules cultivées en monocouches.



#### 4.3.3.3 Cellules cultivées en monocouches

La plupart des cellules mammaires en culture expriment plusieurs des isotypes de RAR et de RXR, ce qui suggère que ces cellules sont sensibles aux effets de l'AR [373, 374]. Et en effet, il est maintenant bien documenté que la croissance de plusieurs lignées mammaires est réprimée *in vitro* par des doses d'AR allant de 10 nM à 1  $\mu$ M [251, 375, 376]. L'AR agit sur ces cellules de diverses façons notamment par la modulation de l'expression de régulateurs de la progression du cycle cellulaire ainsi que de l'apoptose.

Par exemple chez les cellules de carcinome mammaire T47D et MCF-7, l'AR induit une diminution de l'expression des cyclines D1 et D3 dont la surexpression est connue pour participer à l'état de prolifération élevé des cellules de plusieurs cancers [375, 377, 378]. Chez les cellules T47D, l'AR (1  $\mu$ M) cause notamment une augmentation de l'ubiquitination de la cycline D1 ce qui induit sa dégradation par la voie du protéasome [379]. L'activité de CDK2 et la phosphorylation de la sérine 473 d'Akt (PKB) sont diminuées en présence d'AR (1  $\mu$ M) chez les MCF-7 ce qui contribue à l'arrêt de prolifération [380, 381]. L.J. Donato et ses collègues ont montré qu'un simple « pulse » d'AR (1  $\mu$ M) pendant quelques heures induit un arrêt de croissance robuste des cellules MCF-7 2 à 4 jours après. Le mécanisme proposé met en jeu l'induction par l'AR de la protéine Btg2 qui induit en retour une diminution de l'expression de la cycline D1 et donc un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 [382]. Chez les cellules SKBR3 l'arrêt de croissance par l'AR semble mettre en jeu une diminution de l'expression de PKC $\alpha$ , ainsi que du niveau de phosphorylation de ERK MAPK [376]. L'AR (1  $\mu$ M) induit l'expression du facteur de transcription SOX9 et l'arrêt de croissance via divers mécanismes dans les cellules T47D et MCF-7 [383, 384]. Selon le contexte cellulaire, l'AR peut aussi causer l'apoptose, par exemple chez les cellules MCF-7, via l'augmentation de l'activité caspase dans le cytosol [385], cela a notamment été attribuée à l'induction de l'expression et du clivage des caspases 7 et 9 par l'AR d'une façon dose

dépendante [386]. L'AR (1  $\mu\text{M}$ ) cause aussi une diminution de l'expression de la télomérase ainsi que la sénescence chez les MCF-7 [387, 388]. Enfin, l'AR (1  $\mu\text{M}$ ) induit l'expression de marqueurs de différenciation de plusieurs lignées [96, 389].

Les quelques exemples évoqués ici, parmi beaucoup d'autres, montrent que l'AR peut agir de différentes façons simultanément, causant un arrêt de croissance, la sénescence, l'apoptose ou la différenciation dans plusieurs modèles de cellules mammaires. Il semble en outre qu'en plus d'être sensibles à l'AR, les cellules mammaires expriment la machinerie enzymatique qui leur permet de le synthétiser à partir du rétinol.

#### 4.3.3.4 Synthèse de l'AR dans les cellules mammaires *in vitro*

C. Ginestier et ses collaborateurs ont montré qu'une fraction des cellules HMEC a une forte activité aldéfluor® qui a été attribuée à l'expression de RALDH1, un marqueur de cellules souches, comme on l'a vu. Cependant, dans cette étude, seule une minorité des cellules aldéfluor®-positives expriment RALDH1, ce qui suggère qu'une autre RALDH détectée par le kit pourrait être exprimée dans les cellules de la glande mammaire [214]. La sélectivité de ce kit pour RALDH1 n'est d'ailleurs pas connue. Cette étude montre par des expériences d'immunohistochimie que des cellules de la glande mammaire humaine aldéfluor®-positives expriment RALDH1, mais elles sont très rares. En outre, aucun défaut de développement ni de phénotype particulier de la glande mammaire n'a été décrit jusqu'ici chez les souris RALDH1<sup>-/-</sup> [220, 229], son rôle y reste donc obscur.

De façon intéressante, le rétinol diminue la prolifération des cellules HMEC mais après sa conversion en AR. Un inhibiteur de la synthèse d'AR diminue l'effet du rétinol [390]. D'autres auteurs ont aussi montré que le rétinol réprime la prolifération des HMEC via la synthèse d'AR. Ces cellules ont en

effet la capacité de synthétiser de l'AR à partir du rétinol [251] et elles expriment RALDH3 [250]. Ces données suggèrent que RALDH3 pourrait participer à une éventuelle voie de synthèse de l'AR dans la glande mammaire normale. Contrairement aux cellules mammaires normales, plusieurs lignées cancéreuses sensibles aux effets antiprolifératifs de l'AR sont totalement insensibles aux effets du rétinol. Cela a été attribué à une déficience de la synthèse de l'AR [251]. Pour une de ces lignées, les cellules MCF-7, le manque de synthèse d'AR semble résulter, au moins en partie, d'une absence d'expression de RALDH3. En effet, l'expression de RALDH3 donne à cette lignée la capacité de synthétiser l'AR à partir du rétinol [250]. Ces données suggèrent un lien possible entre la capacité de synthétiser l'AR et la sensibilité au rétinol des cellules de cancer du sein. Toutefois les études à ce sujet manquent, le rôle exact de la synthèse de l'AR dans la glande mammaire est largement inconnu. On ignore en particulier le rôle de RALDH1 et RALDH3 qui y sont exprimées.

#### 4.4 Le cancer du sein

Le cancer du sein est une maladie dont l'origine reste relativement mal comprise. Il s'agit pourtant du cancer le plus répandu chez les femmes, notamment au Canada. Selon la société canadienne du cancer, plus de 23000 canadiennes recevront un diagnostic de cancer du sein en 2010, et plus de 5000 vont en mourir. Une canadienne sur neuf aura le cancer du sein durant sa vie, et une canadienne sur vingt-huit en mourra. Il s'agit donc d'un enjeu de santé publique important, même si c'est une pathologie de mieux en mieux traitée.

C'est une maladie très hétérogène, il n'existe pas un type de cancer du sein, mais plusieurs aux caractéristiques différentes. Cela justifie les efforts actuels afin de mieux comprendre et classifier les différents types de tumeurs afin de développer des traitements ciblés contre chacun d'entre eux.

##### 4.4.1 Origines du cancer du sein

La glande mammaire est en évolution constante au cours de la vie de la femme, que ce soit pendant la puberté, le cycle menstruel, la grossesse ou l'involution. Le nombre des cellules en prolifération active ou en cours de différenciation y est important. De plus, elle est soumise à l'influence de plusieurs hormones, dont les estrogènes, tout au long de la vie. Tout cela en fait un tissu particulièrement sensible aux processus de cancérisation. L'immense majorité des tumeurs mammaires surviennent dans l'épithélium, surtout au niveau des tubules, mais très rarement dans le stroma [391, 392].

#### 4.4.2 Hétérogénéité des tumeurs mammaires

De nombreuses études ont montré que les tumeurs de plusieurs tissus étaient hautement hétérogènes, c'est-à-dire qu'elles sont constituées de plusieurs types différents de cellules [393]. Déjà en 1960 J.B. Pierce et ses collègues avaient montré que les cellules d'un tératome pouvaient se différencier spontanément en plusieurs types cellulaires non-cancéreux chez la souris [394]. Le même auteur proposa en 1988 un modèle selon lequel les tumeurs récapitulent le développement normal de l'organe dont elles sont originaires, mais de façon aberrante [395]. Selon cette hypothèse, la tumeur serait la récapitulation pathologique et aberrante d'une portion plus ou moins importante de la hiérarchie des cellules normales du tissu d'origine.

#### 4.4.3 Les cellules souches cancéreuses (CSC)

##### 4.4.3.1 Émergence du concept de CSC

Selon un modèle classique, la transformation d'une cellule normale résulte d'une série de mutations survenant de façon séquentielle. Or un problème discuté depuis plusieurs années est l'identification des cellules normales susceptibles de

donner naissance à une tumeur. Bien que cette question soit toujours activement débattue, des éléments de réponse ont récemment émergé des résultats obtenus par l'étude de divers types de cancers. J.E. Dick a notamment proposé en 1994 que les leucémies de type AML pourraient survenir à la suite de mutations touchant les CSH [396]. T. Reya et ses collaborateurs ont à leur tour proposé en 2001 l'hypothèse selon laquelle les leucémies pourraient survenir à la suite de mutations affectant les cellules souches hématopoïétiques. Cette assertion s'appuie sur le fait que les voies de signalisations qui y sont spécifiquement activées semblent aussi se retrouver fréquemment chez les cellules de leucémie [397]. Les cellules à l'origine des tumeurs furent baptisées cellules souches cancéreuses ou CSC par les promoteurs de cette hypothèse [397]. Toutefois ce terme peut prêter à confusion car il n'implique pas nécessairement que les CSC ont pour origine des cellules souches normales. Il s'agit plutôt d'une analogie fonctionnelle car à l'instar d'une cellule souche qui est à l'origine des divers types cellulaires d'un organe, une seule CSC a théoriquement la capacité de générer *in vivo* une tumeur complète dans toute son hétérogénéité.

#### 4.4.3.2 Les CSC dans le cancer du sein

En ce qui concerne la glande mammaire, une technique analogue à l'implantation de fragments de glande mammaire normale inventée par K.B. DeOme en 1959 a été développée, mais avec des cellules de cancers [300, 301]. Elle permet de quantifier la capacité de cellules de cancer du sein à former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans le coussinet adipeux d'une glande mammaire de souris. Grâce à cette méthode, il fut observé que, de façon surprenante, la formation de tumeurs après transplantation de cellules mammaires cancéreuses était extrêmement inefficace. En effet, il faut injecter jusqu'à 3 millions de cellules dans la glande mammaire d'une souris pour observer une tumeur [398]. Les cellules capables de régénérer une tumeur mammaire, les CSC, sont donc rares. La preuve formelle de leur existence est venue d'expériences effectuées sur les cellules de différents types de cancers.

Elles ont été identifiées dans des tumeurs solides du cerveau et du colon ainsi que des tumeurs mammaires grâce aux marqueurs qui sont utilisés pour identifier les cellules souches normales dans les tissus correspondants [214, 399-402]. Dans des échantillons de tumeurs mammaires humaines, la fraction de cellules  $CD44^+/CD24^-$ , est enrichie en cellules capables de reproduire une tumeur dans sa totalité [399]. De façon frappante, aussi peu que 100 cellules ayant ce profil suffisent à recréer une tumeur. Mais les cellules qui ont un profil alternatif par exemple  $CD44^-/CD24^-$  ou  $CD44^+/CD24^+$  ne forment pas de tumeurs même lorsque plus de 10 000 cellules sont injectées. C. Ginestier et ses collègues ont montré que la fraction aldefluor®-positive des tumeurs mammaires (et du colon) avait une capacité à former des tumeurs supérieure à la fraction aldefluor®-négative [214, 223]. Cela indique que les tumeurs mammaires sont effectivement hétérogènes, constituées d'un faible pourcentage de progéniteurs mais aussi de nombreuses cellules probablement plus différenciées et incapables de former une tumeur.

#### 4.4.3.3 Hétérogénéité des tumeurs mammaires

Par analogie avec le modèle d'organisation hiérarchique du tissu mammaire normal, plusieurs auteurs ont proposé qu'il en était de même dans les tumeurs [399, 403]. Dans le même ordre d'idées, C.M. Fillmore et ses collègues ont montré que les lignées de cancer du sein humaines étaient hétérogènes et contiennent une faible fraction de progéniteurs qui, lorsqu'ils sont isolés de la population totale, sont capables d'en reproduire toute l'hétérogénéité ainsi que de s'autorenouveler indéfiniment, ce qui est précisément la définition d'une CSC [393].

Toutefois, les cellules normales à l'origine des tumeurs mammaires ne sont pas clairement identifiées. Certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle les différents types cellulaires de la hiérarchie de la glande mammaire normale pourraient générer une tumeur [264, 404]. Il n'y a pas de consensus à ce

sujet. Cependant il existe plusieurs catégories de tumeurs distinctes et des études de profils d'expression ont montré que chacune d'entre-elles peut être rattachée à un type cellulaire retrouvé dans l'épithélium normal [405, 406].

#### 4.4.3.4 La transition épithéliale-mésenchymateuse

Les processus qui permettent l'apparition de tumeurs hétérogènes ne sont pas totalement élucidés, toutefois un processus nommé transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM) pourrait y participer. La TEM est un phénomène qui permet à une cellule épithéliale (ectoderme) de se dé-différencier en cellule du mésenchyme. Son rôle normal lors du développement embryonnaire est de générer des cellules moins différenciées susceptibles de migrer dans l'embryon et de se re-différencier dans un autre lieu [407]. Des auteurs ont démontré que plusieurs voies de signalisation affectées dans les tumeurs mammaires, ainsi que l'expression de divers oncogènes peuvent induire la TEM de façon aberrante, ce qui permet la production de CSC [408-410]. C'est le cas par exemple du facteur de transcription GATA-3 dont l'expression est requise pour la différenciation de la lignée luminale. Or la perte de l'expression de GATA-3 a été associée à l'acquisition d'un phénotype de CSC par une TEM [287]. L'expression d'oncogènes comme Ras ou c-Myc dans les cellules mammaires est aussi connue pour induire la TEM [411, 412]. Le maintien de l'hétérogénéité de la tumeur tout au long de la maladie serait un phénomène dynamique, possiblement entretenu ou favorisé par la TEM.

#### 4.4.3.5 Classification des tumeurs mammaires

Quelle que soit l'origine des tumeurs mammaires, plusieurs types distincts ont été décrits et répertoriés. Une classification basée sur des critères purement histopathologiques et cliniques a été utilisée jusque très récemment [413]. Elle est basée sur la détection de seulement quelques bio-marqueurs par

des méthodes immuno-histologiques et est utilisée dans la majorité des laboratoires de pathologie.

L'avènement des techniques d'analyse de profils d'expression (puces à ADN) depuis une dizaine d'années a permis de classifier les tumeurs de façon plus précise et plus fiable, en fonction de l'expression de nombreux gènes. Plusieurs auteurs ont donc cherché à affiner les différentes classes connues [405, 414, 415]. Ces classifications ont pour but d'adapter les traitements en fonction du type de tumeur ainsi que, à un niveau plus fondamental, d'aider à une meilleure connaissance du cancer. Les marqueurs les plus utilisés sont les récepteurs hormonaux ER $\alpha$  et PR et le récepteur membranaire HER-2. Il est à noter que la classification utilisée pour les tumeurs est aussi utilisée pour classifier les cellules mammaires en culture utilisées en laboratoire.

#### 4.4.3.5.1 Les tumeurs lumineales ou ER $\alpha$ -positives

Cette classe regroupe les tumeurs qui expriment le récepteur aux estrogènes ER $\alpha$  et à la progestérone PR, il s'agit de la classe de tumeurs ayant le pronostique le plus favorable et elles représentent environ 75% du total des tumeurs diagnostiquées [416]. Ces tumeurs sont dites hormono-dépendantes car leur croissance est dépendante des estrogènes, notamment en raison de l'expression du récepteur ER $\alpha$ . Elles sont classiquement traitées par des modulateurs de la voie de signalisation des estrogènes (SERM), comme les anti-estrogènes (tel le tamoxifène) [417], ou par des inhibiteurs d'aromatase (enzyme de synthèse du 17 $\beta$ -estradiol) [418-422]. Récemment, des études de profils d'expression de tumeurs ont montré que l'expression du récepteur ER $\alpha$  était un déterminant majeur de la signature des tumeurs dites de type luminal [405, 423, 424]. Autrement dit, les tumeurs qui expriment ER $\alpha$  ont une signature moléculaire très similaire à celle des cellules mammaires lumineales. De ce fait, les tumeurs qui expriment ER $\alpha$  sont couramment qualifiées de lumineales.



Toutefois cette classe est quelque peu hétérogène et sa définition est encore activement discutée et n'est pas unanimement acceptée [425].

#### 4.4.3.5.2 Les tumeurs Her-2-positives

Ces tumeurs expriment le récepteur membranaire HER-2. Il s'agit d'une protéine membranaire dont l'expression, ou la surexpression (le plus souvent causée par l'amplification du locus du gène Her-2) qui participe à l'induction de la prolifération des cellules de ce type de tumeurs, notamment via la voie PI3K/AKT [426]. Elles représentent 15 à 20% du total des tumeurs mammaires diagnostiquées. Il semble qu'il y ait une corrélation inverse entre l'expression de Her-2 et l'expression de ER $\alpha$  dans les tumeurs [427, 428]. Ce type de tumeur a un pronostique beaucoup plus défavorable que les tumeurs lumineales. Toutefois il s'est amélioré depuis l'apparition de traitements à base d'anticorps de souris humanisés dirigés contre le récepteur de surface Her-2, comme l'herceptin® qui s'est montré efficace à induire la rémission [429].

#### 4.4.3.5.3 Les tumeurs basales ou triples négatives

Les tumeurs basales sont dites triple-négatives car elles n'expriment ni Her-2 ni les récepteurs hormonaux ER $\alpha$  et PR. Ce sont les tumeurs dont le pronostique est le plus défavorable [430]. Ce type de tumeur est toutefois relativement mal défini. Il est défini plutôt par l'absence de l'expression de marqueurs caractéristiques des deux autres classes de tumeurs plutôt que par l'expression de marqueurs spécifiques de cette classe. Ce sont en général des tumeurs invasives, peu différenciées, qui donnent souvent lieu à des rechutes et à des métastases distantes [431]. Peu de traitements ciblés existent, toutefois un certain nombre de traitements ciblant ces tumeurs sont actuellement en cours de développement [431]. En outre, elles expriment plusieurs marqueurs caractéristiques des cellules mammaires situées dans la couche basales [431], c'est la raison pour laquelle cette classe est qualifiée de basale. Toutefois cette

classification ne fait pas l'unanimité, il est clair que cette classification est appelée à encore évoluer [430].

#### 4.4.4 Les rétinoïdes et le cancer du sein

Nous avons vu que plusieurs lignées de carcinomes mammaires en culture étaient sensibles aux effets antiprolifératifs de l'AR, comme les MCF-7 ou les SKBR3. Pourtant des défauts de la voie de signalisation de l'AR ont été mis en évidence dans plusieurs lignées cellulaires comme la perte de l'expression de plusieurs isoformes des récepteurs à l'AR comme RAR $\alpha$ 2 et RAR $\beta$ 2 par hyperméthylation du promoteur de leurs gènes respectifs [432, 433]. Or, il a été montré que l'expression d'un dominant négatif des RAR induisait la formation de tumeurs mammaires chez la souris, avec un temps de latence relativement long toutefois [434]. Cela suggère que l'AR pourrait exercer une protection contre la formation de tumeurs mammaires. La perte de sensibilité à l'AR serait donc susceptible de favoriser la formation de tumeurs. D'ailleurs il semble que chez l'humain, l'expression des récepteurs à l'AR dans la tumeur diminue à mesure qu'elle devient plus agressive [435].

Plusieurs études ont montré qu'il existait un lien entre le niveau sanguin de rétinol et l'apparition de différents types de cancers [436, 437]. La carence en vitamine A favorise l'apparition de tumeurs dans plusieurs tissus épithéliaux chez la souris [435]. En bon accord avec ces données, il a été montré que femmes qui ont un cancer du sein ont un taux de survie plus bas lorsqu'elles ont une faible concentration plasmatique de rétinol [438]. Or un niveau de rétinol plus faible pourrait limiter le taux de synthèse d'AR, notamment dans la tumeur. Cependant le lien entre le métabolisme de l'AR et le cancer du sein a été relativement peu étudié jusqu'ici et les données sont assez rares.

Il a été montré il y a près de 20 ans que l'absorption du rétinol est diminuée dans les tumeurs d'un modèle de carcinogénèse mammaire induite

chimiquement chez le rat comparativement aux cellules normales de la glande mammaire [439]. Chez l'humain, il a été observé que l'enzyme du catabolisme de l'AR, CYP26A1, est fortement exprimée dans 42% des tumeurs primaires du sein. En outre, son expression augmente la tumorigénicité de cellules mammaires que ce soit *in vitro* ou *in vivo* chez la souris [440]. Cela suggère l'existence de mécanismes favorisant un faible niveau d'AR dans la tumeur. Certaines données suggèrent en outre que la synthèse d'AR dans la tumeur elle-même pourrait être affectée. En effet, les cellules primaires HMEC en culture expriment RALDH3 comme nous l'avons vu. Elles ont, de plus, la capacité de synthétiser l'AR à partir du rétinol [250]. Ce qui n'est pas le cas des MCF-7. Cette faible capacité de synthèse semble résulter d'une absence d'expression de RALDH3 [250]. Cela suggère que RALDH3 pourrait participer à la synthèse d'AR dans la glande mammaire et antagoniser la formation de tumeurs. En accord avec cette assertion, il a été montré que les souches de souris qui ont une faible expression de RALDH3 dans la glande mammaire sont plus sensibles à la formation de tumeurs [441]. Toutefois le rôle de la synthèse de l'AR dans la glande mammaire a jusqu'ici été peu étudié, contrairement à la signalisation par l'AR.

#### 4.4.5 Les rétinoïdes dans le traitement du cancer

On l'a vu, l'AR possède des propriétés antiprolifératives et pro-différenciatrices marquées envers les cellules mammaires. Tout cela semble indiquer qu'il pourrait être utilisé de façon efficace pour traiter le cancer du sein [374, 442, 443]. Et justement il a été montré que l'AR avait bien une activité anticancéreuse chez plusieurs modèles animaux. Par exemple, l'AR antagonise la formation de lésions *nodular-like* induites par un agent chimique dans la glande mammaire de souris BalbC [444]. Chez le rat, le traitement par l'AR stabilise la croissance de tumeurs mammaires [445]. L'AM580, un agoniste sélectif de RAR $\alpha$ , se montre, lui, relativement efficace dans la prévention de la tumorigénèse chez la souris [446]. Plusieurs auteurs ont développé des ligands de synthèse susceptibles d'agir via les récepteurs RXR en plus des RAR, ils ont été

baptisés rexinoïdes [442]. Certains ont été testés sur des modèles animaux, par exemple le Bexarotène, qui empêche la formation de tumeurs mammaires dans le modèle de souris MMTV-erbB2 [447]. D'autres comme le LGD1069 et l'AR 9-*cis* (qui est le seul rexinoïde naturel) diminuent la croissance de tumeurs chez des modèles de souris [448, 449]. Des tests cliniques ont été conduits sur des patientes atteinte de cancer du sein. Les résultats ont été en général bénéfiques mais modestes et de nombreux effets secondaires ont été notés [450-453]. Une explication classiquement avancée de la faible réponse observée avec les traitements à l'AR est la forte induction de l'expression des enzymes de dégradation CYP26 dans la tumeur ce qui entraînerait une résistance au traitement [440]. Des inhibiteurs de ces enzymes ont donc été testés en combinaison chez l'animal ou sur des modèles de cellules en culture, ils sont nommés RAMBA (*retinoic acid metabolism blocking agents*) [454-457]. Mais jusqu'ici il ne semble pas y avoir d'essais cliniques concluants rapportés chez l'homme avec ces composés pour des raisons qui restent à élucider. Le manque de résultats réellement probants pose la question de la pertinence de l'utilisation des rétinoïdes dans le cancer du sein.

## 5. Problématique

Les rétinoïdes, par leurs effets antiprolifératifs et prodifférenciateurs représentent un point de départ intéressant pour le développement de traitements contre le cancer du sein. La difficulté à mettre au point ce genre de traitements indique que notre compréhension du rôle l'AR dans la glande mammaire n'est peut-être pas suffisante, sa voie de synthèse y est notamment mal caractérisée.

Le but de cette étude est donc d'apporter une meilleure compréhension du rôle de la synthèse de l'AR dans la glande mammaire, et plus particulièrement des enzymes de métabolisme, les RALDH, qui y sont exprimées. Le premier article de cette thèse porte sur la caractérisation enzymatique des RALDH. C'est une étape importante de l'étude fonctionnelle de ces enzymes. Le second article porte sur le rôle de la déficience de synthèse de l'AR dans le cancer du sein. Cet article démontre que la faible synthèse d'AR pourrait faciliter la croissance des tumeurs et ce qui pourrait représenter un nouveau mécanisme de tumorigenèse. Le troisième article porte sur les schémas d'expression des RALDH dans la glande mammaire normale et les tumeurs, ainsi que sur la possibilité d'utiliser les RALDH comme marqueurs des différentes cellules de la hiérarchie de l'épithélium mammaire afin de les isoler et les étudier.

## Résultats

**1<sup>er</sup> article: Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates**

(Publié dans Biochim Biophys Acta. 2009 Dec;1790(12):1660-4.)

### **Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates**

Aurelia Sima<sup>\*\*‡</sup>, Maxime Parisotto<sup>§‡</sup>, Sylvie Mader<sup>§¶</sup> and Pangala V. Bhat<sup>\*\*†</sup>

\*Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)–Hôtel-Dieu, and the Departments of \*Medicine and §Biochemistry and §Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

‡ Contributed equally to this work.

**Keywords:** Retinal isomers; retinal dehydrogenase; retinoic acids,  $\beta$ -ionone.



## Abstract

**Background:** Retinal dehydrogenases (RALDHs) catalyze the dehydrogenation of retinal into retinoic acids (RAs) that are required for embryogenesis and tissue differentiation. This study sought to determine the detailed kinetic properties of 2 mouse RALDHs, namely RALDH3 and 4, for retinal isomer substrates, to better define their specificities in RA isomer synthesis.

**Methods:** RALDH3 and 4 were expressed in *Escherichia coli* as His-tagged proteins and affinity-purified. Enzyme kinetic was performed with retinal isomer substrates. The enzymatic products were analyzed by high pressure liquid chromatography.

**Results:** RALDH3 oxidized all-*trans* retinal with high catalytic efficiency ( $V_{\max}/K_m = 77.88$ ) but did not show activity for either 9-*cis* or 13-*cis* retinal substrates. On the other hand, RALDH4 was inactive for all-*trans* retinal substrate, exhibited high activity for 9-*cis* retinal oxidation ( $V_{\max}/K_m = 27.38$ ), and oxidized 13-*cis* retinal with lower catalytic efficiency ( $V_{\max}/K_m = 8.24$ ).  $\beta$ -ionone, a potent inhibitor of RALDH4 activity, suppressed 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation competitively with inhibition constants of 0.60 and 0.32, respectively, but had no effect on RALDH3 activity. The divalent cation  $MgCl_2$  activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 by 3-fold, did not significantly influence 9-*cis* retinal oxidation, and slightly activated RALDH3 activity.

**Conclusions:** These data extend the kinetic characterization of RALDH3 and 4, providing their specificities for retinal isomer substrates.

**General significance:** The specificities of RALDHs should help in determining their functions in the synthesis of RAs in specific tissues

## Introduction

Retinoic acids (RAs), the biologically-active metabolites of retinol (vitamin A), play a fundamental role in embryogenesis and tissue differentiation through the binding and activation of RA receptors and retinoid X receptors (RXRs) [1, 2]. RAs are synthesized from retinol by successive oxidation in which retinal is an intermediate metabolite. The conversion of retinol to RAs is initially catalyzed by retinol dehydrogenases followed by further oxidation by retinal dehydrogenases (RALDHs) [3-7]. RALDHs are cytosolic aldehyde dehydrogenases (ALDHs) that are part of the superfamily of ALDHs that catalyze the  $\text{NAD}^+$ -dependent oxidation of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal [8-11]. Four isozymes of RALDHs, namely RALDH1-4, differing in specificities for retinal isomer substrates, have been identified and cloned [12-15]. Well-characterized rat, mouse and human RALDH1 and mouse RALDH2 catalyze both all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation, whereas human RALDH1 and mouse RALDH2 not only convert all-*trans* and 9-*cis* retinal but also show activity for 13-*cis* retinal [9-11]. The catalytic activity of RALDH3 for all-*trans* retinal oxidation was first demonstrated by Gruin et al. [14]. However, it remained largely uncharacterized for its role in the synthesis of 9-*cis* or 13-*cis* RA. The cloning and initial characterization of RALDH4 from humans and mice were reported by Lin et al. [15], who demonstrated its high activity for 9-*cis* retinal and relatively low activity for 13-*cis* and all-*trans* retinal in cells transiently transfected with RALDH4 cDNA. However, extensive kinetic characterization of purified recombinant RALDH4 has not yet been performed.

The purpose of this investigation was to undertake detailed kinetic studies of mouse RALDH3 and 4 for retinal isomer substrates and to further characterize the recombinant enzymes for ALDH inhibitor  $\beta$ -ionone [22]. This will allow to compare the kinetic properties of these enzymes with those of previously-reported mouse RALDH1 and 2.

## Materials and Methods

**Reagents:** Retinoids and  $\beta$ -ionone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Purity of the retinoids was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC) and was found to be greater than 99%. They were handled under yellow light to prevent photoisomerization. HPLC grade solvents were obtained from Fisher Scientific (Toronto, Ontario).

**Expression and purification of RALDHs:** Bacterial expression vectors for His-tagged RALDHs were constructed by excision of RALDH3 and RALDH4 cDNA from pT7.7 parental vectors with NdeI/HindIII for RALDH3 and NheI/EcoRI for RALDH4 and cloning into the same sites in pET28a. Sequence analysis verified the correct clone of mouse RALDH3- and RALDH4-pET28a. The resulting recombinant plasmids were transformed into E. Coli BL-21DE3 cells and their expression was induced with 0.4 mmol/L isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside for 16 h at 19°C. Bacterial pellets containing RALDH3 and RALDH4 were sonicated in 20 mM Tris-HCl (pH 7) and MES (pH 5.7) buffers containing 500 mM NaCl, 5% glycerol, 20 mM imidazole and a mixture of protease inhibitors respectively. Lysates were cleared by centrifugation (4,000 g at 4°C for 30 min). His-tagged RALDH3 and RALDH4 proteins from the bacterial supernatants were purified on a Ni-NTA column by eluting the bound proteins with their respective sonication buffers containing 400 mM imidazole. The purity of the recombinant proteins was assessed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE, 10%) stained with Coomassie Brilliant blue.

**Enzyme assays:** RALDH activities for retinal substrates were assayed by measuring RA formation under HPLC, as described earlier [16]. Recombinant RALDH3 was incubated in 10 mM Tris- HCl buffer (pH 8.5) containing 0.02% Tween-80, 161 mM dithiothreitol (DTT), and 603  $\mu$ M NAD in a final volume of 250  $\mu$ l. Purified RALDH4 was incubated in 100 mM HEPES buffer (pH 8.5) containing 500 mM NaCl, 161 mM DTT and 603  $\mu$ M NAD (final volume 250  $\mu$ l). The substrates (all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal) were added to the incubation mixture in 2.5  $\mu$ l dimethylsulfoxide, and the incubations were undertaken at 37°C for 20 min. After incubation, the reaction products were extracted with 400  $\mu$ l butanol:acetonitrile (1:1)

and separated in a 250 x 4.5 mm Phenomenex 10-ODS analytical column (Phenomenex Inc., Torrance CA). Retinoids were eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 ml/min, and quantitated by photodiode array detector that collected spectra between 200 and 500 nm. The kinetic constants of RALDHs for various substrates were obtained by plotting saturation curves under conditions in which enzyme activity was linear with respect to protein concentration and reaction time, and fitting data from the saturation curve to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots with Prism software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA).

## Results and Discussion

Gel electrophoresis of recombinant affinity-purified RALDH3 and RALDH4 revealed an expected molecular mass of 55-54 kDa (Figure 1). To determine substrate specificities, the catalysis of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal to respective RAs by various amounts of RALDH3 and RALDH4 proteins was examined at 10- $\mu$ M substrate concentrations. RALDH3 showed activity for all-*trans* retinal oxidation but not for either 9-*cis* or 13-*cis* retinal substrates (Figure 2 A). On the other hand, RALDH4 was highly active for 9-*cis* retinal oxidation, with low activity for 13-*cis* retinal, and did not catalyze all-*trans* retinal oxidation (Figure 2 B). The rates of RA production by RALDH3 and RALDH4 were linear up to 300 ng of protein (Figure 2). The saturation kinetics of RALDH3 for all-*trans* retinal and RALDH4 for 9-*cis* and 13-*cis* retinal are reported in Figures 3 A and B, respectively. The  $K_m$  and catalytic efficiency ( $V_{max}/K_m$ ) derived from saturation curves for RALDH3 were 3.93 and 77.88, respectively (Figure 6). RALDH4 had similar  $K_m$  for 9-*cis* and 13-*cis* retinal, but catalyzed 9-*cis* retinal oxidation with 3-fold higher efficiency than 13-*cis* retinal (figure 6).

The  $\beta$ -ionone ring strongly inhibited RALDH4 activity and, at 2  $\mu$ M concentration, 9-*cis* and 13-*cis* RA production was reduced by 53% and 63%, respectively. Surprisingly,  $\beta$ -ionone had no effect on RALDH3 activity. Next, we investigated the nature of inhibition by  $\beta$ -ionone on the conversion of 9-*cis* and 13-*cis* retinal to respective RAs by RALDH4.  $\beta$ -ionone competitively suppressed 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation with inhibition constants ( $K_i$ ) of 0.61 and 0.32, respectively (Figure 4). We and others have shown that magnesium ions influence RALDH1 and RALDH2 activities [9, 10, 17]. Therefore, we examined the effects of magnesium on RALDH3 and RALDH4 activities for retinal substrates. Magnesium slightly activated RALDH3 activity for all-*trans* retinal oxidation (Figure 5 A). Interestingly, magnesium ions activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 by 300% (Figure 5 B). However, magnesium at lower concentration had no effect on RALDH4 activity for 9-*cis* retinal, and, at 4 mM concentration, inhibited 9-*cis* retinal oxidation by 30% (Figure 5 B).

Human RALDH3 (ALDH6) was first cloned by Hsu et al. [18] and later isolated from chicks and mice by Gruin et al. [14]. RALDH3 sequences share 69% amino acid conservation between RALDH1 and RALDH2, and 48% between RALDH4, and amino acid residues found in the catalytically-active sites of ALDHs are conserved. RALDH3 is strongly expressed in sensory neuroepithelia which include the ventral retina, olfactory epithelium and otic vesicle [14, 19], and its deletion leads to choanal atresia with respiratory death in early postnatal life [20]. Normal human mammary cells express RALDH3, and its expression is lost in breast cancer cells, indicating its role in providing RA needed to maintain the normal mammary gland phenotype [21]. Although RALDH3 is capable of catalyzing the oxidation of all-*trans* retinal to RA [14], its activity for other retinal isomer substrates, such as 9-*cis* and 13-*cis* retinal, is not clearly established. We demonstrated that RALDH3 is specific for all-*trans* retinal, suggesting its involvement in the production of all-*trans* RA required for the functioning of specific tissues. The catalytic efficiency of RALDH3 for all-*trans* retinal is 10-fold higher than that of mouse RALDH1 and RALDH2, which also catalyze 9-*cis* retinal oxidation with equal efficiency [9, 10]. Interestingly,  $\beta$ -ionone, the ring structure of all-*trans* retinal, is not a major recognition site of RALDH3, as it did not inhibit its activity. This observation was also reported by Graham et al. [22]. The high specificity of RALDH3 for all-*trans* retinal indicates the requirement of restricted all-*trans* configuration of the carbon side chain in the retinal substrate. Lin et al. noted high mouse RALDH4 activity for 9-*cis* retinal, lower activity for 13-*cis* retinal, and very low activity for all-*trans* retinal in homogenates of CHO-K1 cells transiently expressing this enzyme [15]. Our results on purified recombinant RALDH4 are consistent with those of Lin et al. with respect to activity towards 9-*cis* and 13-*cis* retinal. However, we did not observe any activity of RALDH4 for all-*trans* retinal. It is likely that the very low activity for all-*trans* retinal that they discerned in their study might have originated from the CHO-K1 cells. It is noteworthy that the amino acid sequence of RALDH4 is the most divergent enzyme within the RALDH1 to 4 group [15]. The catalytic efficiency of RALDH4 for 9-*cis* retinal oxidation is 3- and 25-fold higher than that of mouse RALDH1 and RALDH2, respectively, indicating that RALDH4 converts 9-*cis* retinal to 9-*cis* RA more

efficiently than RALDH1 and 2. It is interesting that  $\beta$ -ionone competitively inhibits both 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4, which suggests that the  $\beta$ -ionone ring of retinal is one of the important recognition sites for the catalysis of retinal substrates. Magnesium has been shown to stimulate catalysis by RALDH2 and to inhibit RALDH1 activity [9,10]. RALDH3 activity was slightly stimulated by magnesium at higher concentrations (Figure 5 A). On the other hand, magnesium dramatically activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 without significantly affecting 9-*cis* retinal oxidation. Although the exact mechanisms by which magnesium affects RALDH activities are not known, it is believed to affect NADH release which may influence the activities of RALDHs [23, 24]. The isomeric configuration of retinal substrates may alter the orientation of RALDH protein which may impact the release of NADH in the presence of magnesium.

RALDH4 is expressed in the adult mouse liver and kidney [15]. However, its function *in vivo* is not known. Although 9-*cis* RA binds to RXRs, whether it is an endogenous ligand for these receptors *in vivo* has not yet been fully demonstrated. Since the occurrence of 9-*cis* RA *in vivo* is controversial [25, 26], and the role of RALDH4 in mouse development has not yet been investigated, it is not clear whether RALDH4 is involved in 9-*cis* RA biosynthesis *in vivo*. On the other hand, *in vitro* enzyme assays clearly demonstrated the occurrence of retinoid dehydrogenases capable of converting 9-*cis* retinol to 9-*cis* RA via 9-*cis* retinal [4, 7, 9-11]. In addition, 9-*cis* RA catabolising enzyme CYP26C1 exists in nature [27]. These observations provide circumstantial evidence that 9-*cis* RA may be formed *in vivo* from all-*trans* retinol. However, firm demonstration of 9-*cis* RA occurrence *in vivo* and of the role it plays in cell differentiation and embryogenesis via RXRs will require further research.

### **Acknowledgement**

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-81319).

## References

- [1] L.M. De Luca, Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J.* 5 (1991) 2923-2933.
- [2] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.* 10 (1995) 940-954.
- [3] G. Duester, Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis, *Biochemistry* 24 (1996) 12221-12227.
- [4] J.L. Napoli, Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63 (1999) 139-188.
- [5] J. Labrecque, P.V. Bhat, A. Lacroix, Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid, *Biochem. Cell Biol.* 71 (1993) 85-89.
- [6] J. Labrecque, F. Dumas, A. Lacroix, P.V. Bhat, A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid, *Biochem. J.* 305 (1995) 681-684.
- [7] J.R. Mertz, E. Shang, R. Piantedosi, S. Wei, D.J. Wolgemuth, W.S. Blaner, Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinol oxidation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 33125-33131.
- [8] P.V. Bhat, Role of retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) in retinoic acid biosynthesis, *Enzymol. Mol. Biol.* 12 (2005) 66-72.
- [9] I. Gagnon, G. Duester, P.V. Bhat, Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) for retinal substrates, *Biochim. Biophys. Acta* 1506 (2002) 156-162.
- [10] I. Gagnon, G. Duester, P.V. Bhat, Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1685-1690.
- [11] P.V. Bhat, H. Samaha, Kinetic properties of human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 195-197.



- [12] P.V. Bhat, J. Labrecque, J.-M. Boutin, A. Lacroix, A. Yoshida, Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation, *Gene* 166 (1995) 303-306.
- [13] D. Zhao, P. McCaffery, K.J. Ivins, R.L. Nerve, P. Hogans, W.W. Chin, U.C. Drager, Molecular identification of a major retinoic acid synthesizing a retinaldehyde-specific dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 240 (1996) 15-22.
- [14] F. Gruin, Y. Hirose, S. Kawauchi, T. Ogura, K. Umesono, Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development, *J. Biol. Chem.* 2000 (275) 41210-41218.
- [15] M. Lin, M. Zhang, M. Abraham, S.M. Smith, J.L. Napoli, Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9856-9861.
- [16] H. Brodeur, M. Parisotto, S. Chagnon, S. Mader, P.V. Bhat, Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenases, *Biochim. Biophys. Acta.* 1770 (2007) 1548-1556.
- [17] E.C. Kathmann, S. Naylor, J.J. Lipsky, Rat liver constitutive and phenobarbital-induced cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes, *Biochemistry* 39 (2000) 11170-11176.
- [18] L.C. Hsu, W.C. Chang, L. Hiraoka, C.L. Hsieh, Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6, *Genomics* 24 (1994) 333-341.
- [19] F.A. Mic, A. Molotkov, F. Fan, A.E. Cuenca, G. Duester, RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development, *Mech. Dev.* 97 (2000) 227-230.
- [20] V. Dupé, N. Matt, J.M. Garnier, P. Chambon, M. Mark, N.B. Ghyselinck, A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 14036-14041.

- [21] B.N. Rexer, W.L. Zheng, D.E. Ong, Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 7065-7070.
- [22] C.E. Graham, K. Brocklehurst, R.W. Pickersgill, M.J. Warren, Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3, *Biochem. J.* 394 (2006) 67-75.
- [23] F.M. Dickinson, G.J. Hart, Effects of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Biochem. J.* 205 (1982) 443-448.
- [24] K.K. Ho, A. Allai-Hassani, T.D. Hurley, H. Weiner, Differential effects of  $Mg^{2+}$  ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases, *Biochemistry* 44 (2005) 8022-8029.
- [25] F.A. Mic, A. Molotkov, D.M. Benbrook, G. Duester, Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 7135-7140.
- [26] R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, R.B. Stein, G. Eichele, R.M. Evans, C. Thaller, 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor, *Cell* 68 (1992) 397-406.
- [27] M. Taimi, C. Helvig, J. Wisniewski, H. Ramshaw, J. White, M. Amad, B. Korczak, M. Petkovich, A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-*cis* and all-*trans* isomers of retinoic acid, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 77-85.

**Figure legends**

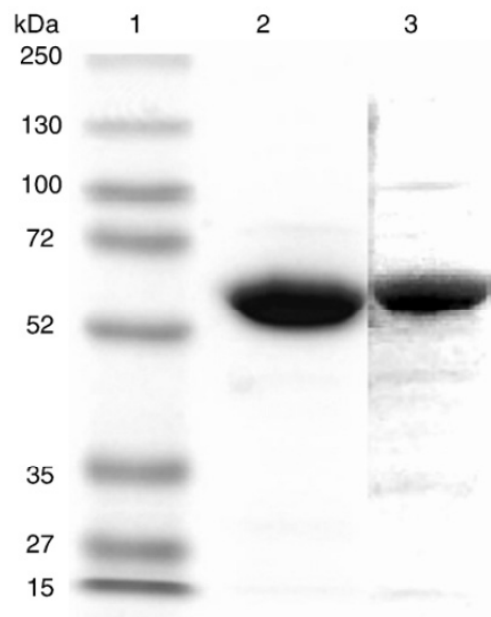
**Figure 1. Lanes:** 1. protein standards, 2. and 3. RALDH3 (10  $\mu\text{g}$ ) and RALDH4 (6  $\mu\text{g}$ ) respectively purified in a Ni-NTA column.

**Figure 2.** Rates of all-*trans* RA (■) synthesis from all-*trans* retinal by RALDH3 (A), and 9-*cis* (●), and 13-*cis* (▲) RA synthesis from respective retinal substrates by RALDH4 (B), with increasing protein concentrations. Each point in the curve represents the average of triplicate values (less than 6% variation between each replicate).

**Figure 3.** Kinetic saturation curves of RALDH3 (A) and RALDH4 (B) with retinal isomers. Incubations were performed at 37°C for 20 min with protein. All-*trans* (■), 9-*cis* (●), and 13-*cis* retinal (▲). Each point in the curve represents the average of 3 replicates (less than 6% variation between each replicate).

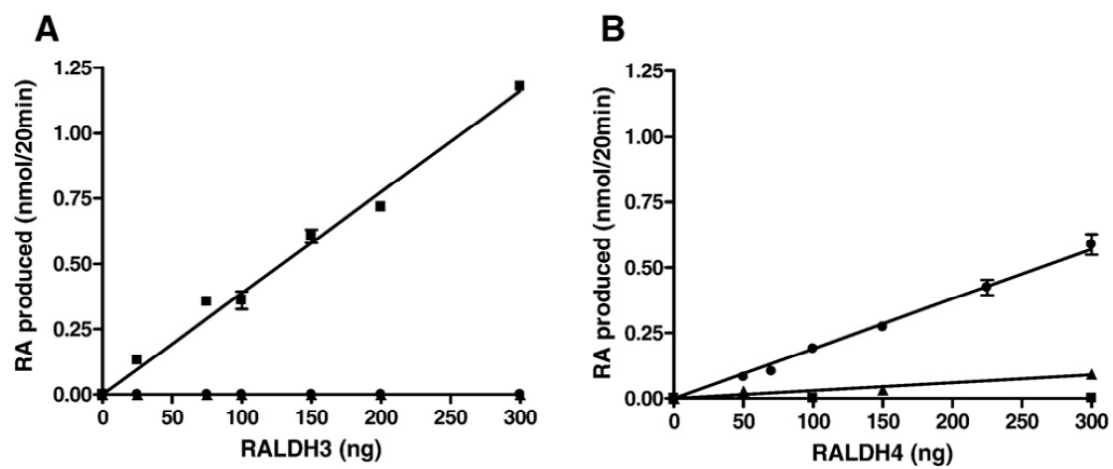
**Figure 4.** Competitive inhibition by  $\beta$ -ionone of 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation catalyzed by RALDH4. Retinal concentrations were maintained at 10  $\mu\text{M}$ . Each point on the curve represents the average of 3 replicates (less than 5% variation between each replicate).

**Figure 5.** Effects of  $\text{MgCl}_2$  on RALDH3 (A) and RALDH4 activities (B). Assays were performed with 0.2 mg protein, 10  $\mu\text{M}$  all-*trans* (■), 13-*cis* (▲), and 9-*cis* (●) retinal under incubation conditions described in methods. Points are the average of duplicate experiments, each carried out in triplicate.



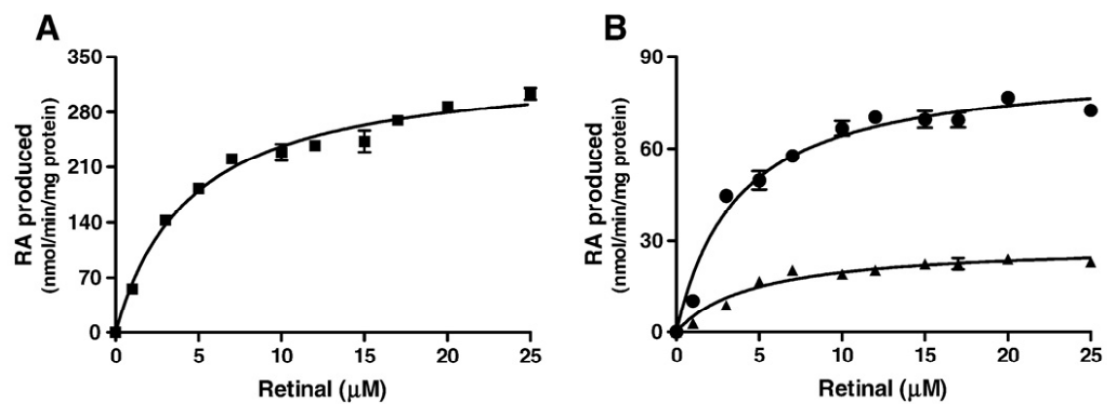
**Figure 1**

SDS-PAGE of purified recombinant RALDH3 and RALDH4.



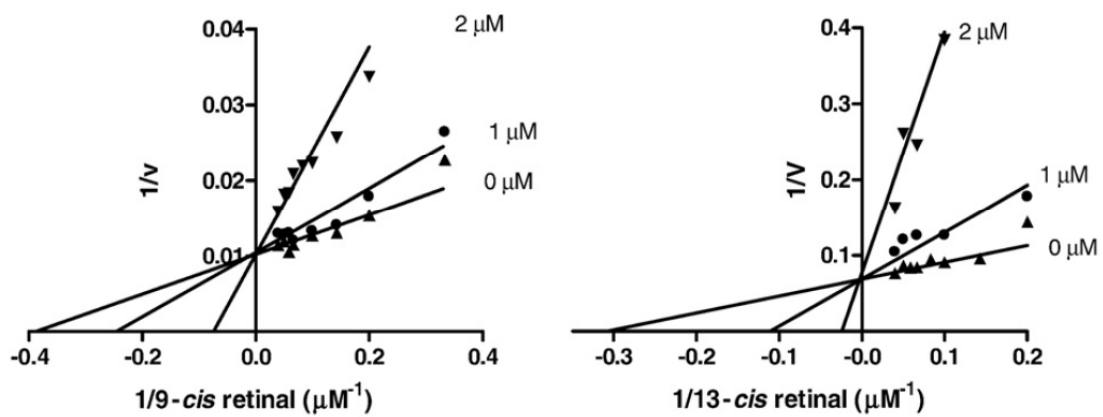
**Figure 2**

Rates of all-*trans* RA synthesis from retinal by RALDH3 (A) and RALDH4 (B)



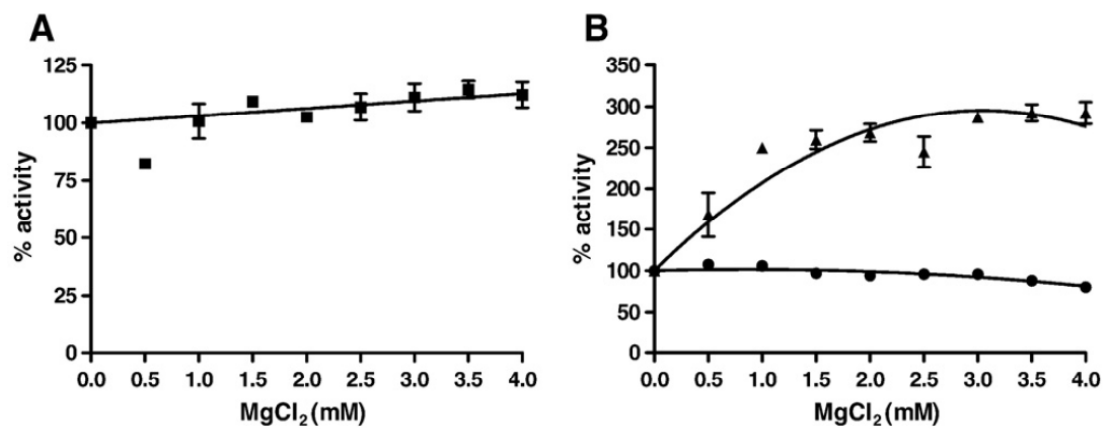
**Figure 3**

Kinetic saturation curves of RALDH3 (A) and RALDH4 (B) with retinal isomers.



**Figure 4**

Competitive inhibition by  $\beta$ -ionone of 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation catalyzed by RALDH4



**Figure 5**

Effects of MgCl<sub>2</sub> on RALDH3 (A) and RALDH4 activities (B)



Retinal	RALDH3			RALDH4		
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nmol/ min/mg)	$V_{\text{max}}/K_m$	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (nmol/ min/mg)	$V_{\text{max}}/K_m$
all- <i>trans</i>	$3.9 \pm 0.7$	$306.2 \pm 38.2$	77.9	–	–	–
9- <i>cis</i>	–	–	–	$3.0 \pm 0.6$	$80.8 \pm 4.8$	27.4
13- <i>cis</i>	–	–	–	$3.4 \pm 0.4$	$27.7 \pm 2.1$	8.2

**Figure 6**

Kinetic parameters for RALDH3 and RALDH4 for retinal isomers

**2<sup>e</sup> article : Low RALDH activity in luminal breast tumors enables proliferation of retinoic acid-sensitive cancer cells**

(Soumis à EMBO Journal)

## **Low RALDH activity in luminal breast tumors enables proliferation of retinoic acid-sensitive cancer cells**

Maxime Parisotto,<sup>1,2</sup> Marieke Rozendaal,<sup>1,2</sup> Nader Hussein,<sup>1</sup> Slim Fourati,<sup>1,2</sup> Carolyn Nessim,<sup>1</sup> Martine Bail,<sup>1</sup> Hiba Zahreddine,<sup>1</sup> Andrée-Anne Grosset,<sup>3#</sup> André Robidoux,<sup>4</sup> Louis Gaboury,<sup>1,3,5</sup> Pangala V. Bhat,<sup>5,6</sup> Sylvie Mader<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, <sup>2</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, <sup>3</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal, <sup>4</sup> Department of Surgery, Université de Montréal, <sup>5</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM)-Hotel-Dieu, <sup>6</sup>Department of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

**Additional footnotes:** <sup>#</sup>Current address : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

**Conflict of interest:** the authors have declared that there is no conflict of interest.

List of non-standard abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine; ER $\alpha$ , estrogen receptor alpha; HMEC, human mammary epithelial cell; IHC, immunohistochemistry; ICI, ICI182,780; mAU, milli absorbance unit;; RA, retinoic acid; RALDH, retinal dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor;

RARE, retinoic acid response element; RXR retinoid X receptor; Tam, tamoxifen.

**ABSTRACT:**

Although retinoic acid (RA) is antiproliferative in some breast cancer lines, its synthesis and importance in the control of cell proliferation in normal and tumorigenic breast epithelial cells remain poorly characterized. We show that RALDH3 expression correlates with RA synthesis in normal and transformed human breast epithelial cells, and in normal mouse luminal breast epithelial cells. However, both RALDH3 expression and retinal oxidizing capacity are low in RA-sensitive human luminal tumor cells. Expression of functional RALDH3 induces RA signaling and decreases proliferation of several luminal breast cancer cell lines, suggesting that low RALDH3 levels account for the capacity of these cells to proliferate in the presence of retinol. RALDH1, a marker of mammary stem cells, was markedly less efficient than RALDH3 in restoring RA signaling. Endogenous RALDH3 expression is induced by RA, leading to a positive feed-back regulatory loop in RA synthesis in the presence of retinol. However, estrogens suppress retinoid stimulatory effects, likely contributing to low RALDH3 levels in luminal tumor cells, while treatment with antiestrogens or estrogen deprivation increased RALDH3 expression. RALDH3 may thus contribute to therapeutic success in estrogenic blockade therapies. Accordingly, higher RALDH3 levels correlate with a better chance of distant metastasis-free survival in ER-positive tumors.

## INTRODUCTION

Modulation of retinoid intake from the diet as well as pathological or experimental alterations in receptor expression patterns have demonstrated the important roles of retinoids in embryonic development [1], but also in cell differentiation and cancer [2-5]. Vitamin A deficiency has been linked with a higher incidence of cancer and increased susceptibility to chemical carcinogens [6, 7], whereas natural or synthetic retinoids prevent carcinogen-induced tumorigenesis in various tissues including breast [8, 9]. Retinoids have been used successfully as chemopreventive agents in patients with pre-malignant lesions (actinic keratinosis, oral leukoplakia, cervical dysplasia and xeroderma pigmentosum) or to reduce second malignancies in skin, oral, lung, liver or breast cancer [6, 7]. Retinoids have also been shown to be active in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), juvenile chronic myelogenous leukemia, Kaposi's sarcoma, prostate cancer and neuroblastoma [6, 7, 10]. However, the precise roles of retinoid signaling in the maintenance of adult tissue differentiation and the potential escape mechanisms during tumorigenesis are still poorly understood.

The all-*trans* and 9-*cis* isomers of retinoic acid (RA), which are the principal forms of retinoids associated with cell differentiation and tumor prevention, are ligands for two distinct families of nuclear receptors, the RARs, which interact with the two RA isomers, and the RXRs, which interact specifically with 9-*cis* RA [11, 12]. RA receptors act as transcription factors, associating to specific DNA sequences [13-16]. Although cell-specific receptor expression patterns play an important role in determining sets of target genes [13, 15, 16], expression of RA-synthesizing enzymes is required for tissular response to RA since its circulating levels are too low to trigger gene transcription [17, 18]. RA is synthesized in tissues expressing appropriate enzymes by a two-step oxidation of serum retinol, which originates from conversion of  $\beta$ -carotene and dietary or liver-stored retinyl esters. The first step produces retinal and is reversible, while the second step, which leads to RA, is irreversible and controlled by aldehyde dehydrogenases that recognize retinal as a substrate. Three retinal dehydrogenases (RALDH1-3), corresponding to ALDH1A1,

ALDH1A2, ALDH1A3, respectively [19] catalyze oxidation of all-*trans* retinal [20]. *Raldh2* gene deletion in mice results in early embryonic lethality due to defective heart morphogenesis and demonstrates abnormal patterning of the hindbrain and altered somatic development; this phenotype can be rescued to a large extent by maternal RA administration [21, 22]. *Raldh3* knockout causes malformations in the ocular and nasal regions and results in choanal atresia, which is responsible for death at birth and can be rescued by RA treatment [23, 24]. *Raldh1* is dispensable for development *in utero* and for post-natal life, but RA synthesis is reduced in the developing eye and in the liver of *Raldh1*(-/-) mice, indicating a contribution to RA synthesis *in vivo* [25, 26].

In the adult, RALDHs are expressed broadly in various organs, notably in epithelia that depend on RA for normal differentiation [20, 27]. High ALDH activity has been detected in hematopoietic, neural and mammary stem and progenitor cells [28-31]. In addition, high ALDH activity in breast carcinomas identifies a cell fraction capable of generating with high efficiency tumors that recapitulate the heterogeneity of the parental tumor [31, 32]. A role of RALDH1 in early differentiation of human hematopoietic stem cells through its RA synthesizing capacity has been proposed [33], although RALDH1 was found to be dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems [34].

Although suppression of receptor expression represents a mechanism of escape from the differentiating effects of RA [7, 35], accumulating evidence also points to an alteration of RA biosynthesis during tumorigenesis. RA concentrations are lower in prostate tumor tissues than in corresponding normal tissues [36]. RALDH2 expression is reduced in prostate tumors, correlating with shorter remissions, and is increased by treatment with the DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine in the DU145 prostate cancer cell line [37]. In an N-methyl-N-nitroso-urea induced mammary carcinoma model, retinal oxidase activity was reduced compared to normal rat tissues [38]. Other studies described a reduction in RA synthesis from retinol in specific human breast cancer cell lines compared to normal or immortalized cells [39, 40]. Transient expression of RALDH3 restored RA synthesis from retinol in MCF-7 breast carcinoma cells [41], pointing specifically to

low RALDH activity in this tumor cell line. However, RALDH expression has not been characterized systematically in different breast tumor types and the potential roles of individual RALDHs in controlling breast tumor epithelial cell proliferation remain to be investigated.



## RESULTS

### **Retinal oxidation is deficient in tumor cell lines:**

Synthesis of RA from retinol (2  $\mu$ M) was previously found to be impaired in 5 out of 6 tested cancer cell lines compared to primary or immortalized cells [39]. Defects in RA synthesis may result from loss of enzymes converting either retinol to retinal, or retinal to RA. In order to assess whether breast cancer cell lines have a lower capacity to synthesize RA from retinal, protein extracts from primary mammary epithelial cells (HMEC), from 2 immortalized cell lines and from 9 transformed cell lines were tested for all-*trans* retinal oxidation *in vitro* as previously described [42]. RA production was detected in HMECs and in immortalized 184B5 and MCF-10F cells (Figure 1A), but was very low in luminal (MCF-7, T47D, ZR-75, BT-474, SKBR3, MDA-MB-361) or basal B (MDA-MB-231) breast tumor cell lines [43]. Significant activity was only observed in two basal A cell lines, BT-20 and MDA-MB-468 (Figure 1A). To verify these findings under cell culture conditions, we incubated selected cell lines with retinol (2  $\mu$ M) for 18 h and detected production of RA by HPLC analysis of cell culture media. RA formation was observed for MDA-MB-468, BT-20, but not for BT-474, MDA-MB-231, SKBR3 or MCF-7 cells (Figure 1B and data not shown), in agreement with results observed *in vitro*.

### **RALDH3 expression correlates with RA synthesizing activity in breast cancer cell lines:**

To identify the specific RALDH(s) responsible for RA production in breast epithelial cells, we initially compared RALDH expression profiles in breast cell lines both at the mRNA and protein levels. While expression of RALDH1 and RALDH2 was extremely low in normal human mammary epithelial cells (HMECs) and in immortalized cells 184B5 and MCF-10F (Figure 2 A, B and D), high-level expression of RALDH3 was observed in these cells (Figure 2 C and D).

In tumor cell lines, RALDH1 expression was high in the basal A MDA-MB-468 and lower, but detectable both at the mRNA and protein levels, in HER2-expressing luminal BT-474, SKBR3 and MDA-MB-361 cells (Figure 2A and D). RALDH2 was detected at the RNA level in MDA-MB-468 cells only (Figure 2B). On the other

hand, RALDH3 expression was high in transformed basal A MDA-MB-468 and BT-20 cells, but very low in basal B MDA-MB-231 and in all luminal cells both at the mRNA and protein levels (Figure 2C and D), correlating well with *in vitro* and *in vivo* RALDH activity (Figure 1A-B). We cannot exclude that RALDH1 and/or RALDH2 expression also contributes to RA synthesis in cells such as MDA-MB-468, which co-express RALDH3. However, RALDH1 expression in BT-474 cells is not sufficient to yield significantly higher *in vitro* or *in vivo* RA synthesis than in other luminal cell lines (Figure 1A-B).

### **RALDH3 expression correlates with RA synthesis in normal mouse mammary luminal epithelial cells.**

To characterize RALDH3 expression patterns *in vivo* and correlate its expression with RA synthesis, we used the RARE-hsp-LacZ reporter mouse line that synthesizes  $\beta$ -gal in an RA-stimulated manner. We performed immunohistochemistry on mammary glands from these mice using the antibody validated for specific RALDH3 recognition in breast cell lines (see above and supplemental Figure 1 for specificity of the antibody for RALDH3-expressing cells under IHC conditions) or an antibody against  $\beta$ -gal. In the mammary glands of adult mice, both RALDH3 and  $\beta$ -gal were detected in ductal epithelial cells by single staining (Figure 3A). Co-staining with SMA, a marker of myoepithelial cells (Figure 3B), indicates that staining localizes predominantly in luminal cells for both RALDH3 and  $\beta$ -gal. These results suggest that RALDH3 contributes to RA synthesis in the luminal epithelial compartment in mice. By contrast, expression of RALDH1 was not detectably observed in epithelial cells of the adult virgin mouse mammary gland (Supplemental Figure 2A).

### **RALDH3 expression is comparatively low in luminal tumors:**

To assess RALDH3 expression in the human mammary gland, we stained normal tissues with the RALDH3 antibody. RALDH3 expression was observed predominantly in ductal cells in samples from two different individuals (Figure 4; tissue in 4A is normal tissue adjacent to an ER $\alpha$ -positive tumor; tissue in 4B is

normal tissue from reduction mammoplasty). In ducts, RALDH3 expression was localized in luminal cells. By contrast, RALDH1 expression was observed mostly in discrete epithelial cells in breast lobules (Supplemental Figure 2B, arrows).

As expression of RALDH3 was observed in luminal cells both in mouse and in human mammary glands, but its levels were low in all luminal tumor cell lines compared to normal or immortalized breast epithelial cells, we examined its expression in an ER $\alpha$ -positive tumor. Transformed, ER $\alpha$ -positive cells did not stain detectably for RALDH3 whereas ER $\alpha$ -negative duct-like structures included in the tumor displayed RALDH3 expression (Figure 5A-B), suggesting lower RALDH3 expression in the tumor cells (see also Figure 4A for normal adjacent tissue of the same tumor). In contrast, expression of RALDH3 was detected in an ER $\alpha$ -negative tumor (Figure 5C).

To examine whether low RALDH3 expression is associated specifically with ER $\alpha$ -positive (luminal) tumors, we first analyzed RALDH3 mRNA expression in different published tumor datasets with associated microarray analyses [44-47]. Tumor types were determined using the PAM50 classifier [48]. In all four datasets, RALDH3 expression was lower in luminal than in HER2-positive (HER2+) or basal tumors (Scheffe test:  $p < 0.0005$  in all four graphs, Figure 6A). We then analyzed a tumor microarray comprising 140 invasive carcinomas classified in ER $\alpha$ -positive, HER2-positive and triple-negative types (triplicate cores were arrayed for each tumor). Scores were attributed to each core based on intensity of staining (Figure 6B), and distribution of average scores of triplicates were analyzed for each tumor type (Figure 6C). Luminal tumors were associated with lower scores ( $< 2$ ) with a  $p$  value of 0.000216 in the  $\chi^2$  contingency test. Histogram and pie chart score distributions illustrate the lower representation of high scores in luminal tumors (Figure 6D-E), consistent with the low expression levels observed above in luminal cell lines.

These results, together with those described above (Fig 1-5), suggest that RALDH3 is under-expressed in luminal tumors versus normal luminal cells.

**RA-sensitive tumor cell lines express low levels of RALDH3.**

The antiproliferative effects of RA have been reported to affect mostly luminal cell lines [49-51]. We therefore examined the correlation between sensitivity to RA and RALDH3 expression in breast cancer cell lines. In agreement with these reports, all RA-sensitive lines were luminal breast cancer cell lines (SKBR3, BT-474, ZR-75, MCF-7 and T47D, Figure 1C) and had low levels of RALDH3 expression and RALDH activity (Figure 1A-B and 2C-D). Conversely, lines that expressed significant levels of RALDH3 protein and have RALDH activity *in vitro*, were not growth-inhibited by incubation with RA (MDA-MB-468 and BT-20, Figure 1C). In addition, two cell lines were both RA-insensitive and RALDH3-low (MDA-MB-231 and MDA-MB-361, Figure 1C).

In contrast to cancer cells, normal or immortalized cells, which can synthesize RA from retinol, were sensitive to RA. Note however that HMEC cells are routinely cultured in serum-free MEGM medium, and that their growth in medium with serum is markedly less efficient, consistent with inhibitory effects of intra- or autocrine RA synthesis. In addition, sensitivity of immortalized 184B5 cells to RA was observed only in the absence of EGF supplementation, consistent with a role of EGF in suppressing RA signaling [52].

Together, these results suggest that the capacity of RA-sensitive cells to proliferate in the presence of retinol (~100-200 nM in medium with 10% serum as assessed by HPLC; data not shown), may depend on low RALDH3 expression.

**Expression of RALDH3, but not its catalytically inactive mutant, mimics the antiproliferative effects of RA on luminal cell lines.**

Since expression of RALDH3 is low in RA-sensitive luminal cells, we transiently expressed in these cells an HA-tagged RALDH3 or a mutant carrying a C314A mutation, which abrogates *in vitro* enzymatic activity (data not shown), together with a membrane-targeted EGFP expression vector, in order to test the impact on cell cycle distribution. Western analysis of transfected ER-negative luminal SKBR3 cells indicated that expression levels of RALDH3 and of its mutant were comparable (Figure 7A). In addition, RALDH3 protein levels in transfected SKBR3 cells were

comparable to those in RALDH3-expressing 184B5 immortalized cells (Supplemental Figure 3; note that the faster migrating band in the RALDH3-transfected lane corresponds to endogenous RALDH3 induced by a positive feedback loop, see below). HPLC analysis of the culture media of transfected cells revealed that expression of RALDH3, but not of its catalytically inactive mutant, led to synthesis of RA from retinol present in the culture medium (Figure 7B). To verify that RA synthesis had a functional impact on gene expression, we assessed expression of SOX9, a well-characterized RA target gene in breast cancer cell lines [53]. Expression of SOX9 was not detectably altered by expression of the catalytically inactive mutant, but was markedly enhanced by expression of RALDH3 (Figure 7A), suggesting that RA signaling takes place. In addition, mRNA levels of three additional RA target genes (CYP26A1, RARB2, FOXA1) were upregulated as soon as 24 h after RALDH3 transfection (Supplemental Figure 4). Finally, transfected EGFP-positive cells expressing WT RALDH3 displayed about 10% increase in the G0/G1 content ( $p < 0.01$  in Student's t test) in FACS analysis, while no change was observed in cells expressing the catalytically inactive mutant (Figure 7C). These effects mimic those of RA treatment (1  $\mu\text{M}$ ), which led to a 15% increase in G0/G1 content (or almost a 2.5-fold reduction in cells in any other phase of the cell cycle; Figure 7C). RA treatment or expression of RALDH3, but not of its catalytically inactive mutant, also led to significant decreases in the incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) in SKBR3 cells (Figure 7D-E).

Similar results were obtained using ER $\alpha$ -positive ZR-75 cells. RALDH3 expression to levels similar to those in 184B5 cells (Supplemental Figure 3) resulted in G0/G1 growth arrest and SOX9 expression in a retinol dose-dependent manner, while expression at comparable levels of its catalytically inactive mutant was without noticeable effects (Supplemental Figure 5). Because transiently transfected MCF-7 cells tend to aggregate, complicating FACS analysis, we attempted to stably express RALDH3 or its catalytically dead mutant in these cells by retroviral infection. While selection in serum-containing medium yielded cell populations with counter-selected expression of WT, but not mutant RALDH3 (data not shown), comparable levels of expression of the two proteins were achieved by cultivating MCF7 cells in serum-free

medium. A colony formation assay in medium containing 100 nM retinol led to a clear reduction in number and size of the colonies, indicating that RALDH3 also plays an antiproliferative role in MCF7 cells (Supplemental Figure 6). Finally, contrary to results obtained in luminal cells, expression of RALDHs in RA-insensitive basal MDA-MB-231 cells did not affect the cell cycle in a significant manner (data not shown). Together, these results indicate that over-expression of RALDH3 in RALDH-low luminal cells sensitizes these cells to serum levels of retinol through RA synthesis, induction of RA target genes and growth arrest.

**RALDH1 is less efficient than RALDH3 in RA synthesis and cell cycle arrest in luminal cell lines.**

The reported expression of RALDH1 in populations enriched in normal and cancer mammary epithelial stem cells [31, 32] prompted us to compare its RA-synthesizing properties with those of RALDH3 in SKBR3 (Figure 7) and ZR-75 (Supplemental Figure 5) breast cancer cell lines. Although RALDH1 and its catalytically inactive mutant (mutation C303A resulting in loss of catalytic activity *in vitro*, data not shown) were expressed to levels similar to those of RALDH3 in SKBR3 cells (Figure 7A), RALDH1 expression did not lead to detectable RA levels in medium supernatants, had only minor effects on SOX9 protein expression and non-significant effects on the cell cycle in the absence of added retinol. In ZR-75 cells, RALDH1 was also markedly less efficient than RALDH3 at inducing SOX9 expression (supplemental Figure 5A) and G0/G1 arrest (supplemental Figure 5B). Supplementation with retinol (100 nM) increased the G0/G1 cell fraction in cells transfected with RALDH1 or RALDH3, but not with their corresponding mutants, demonstrating that these effects are dependent on the catalytic activity of these enzymes.

**RALDH3 expression is inhibited by 17 $\beta$ -estradiol but restored upon suppression of estrogen receptor signaling in luminal breast cancer cell lines.**

As RALDH3 expression is low in all RA-sensitive, ER $\alpha$ -positive breast cancer cell lines, we tested whether it is modulated by RA and/or E2 treatment. Unexpectedly,

RA treatment of MCF7 cells maintained in estrogen-depleted medium induced RALDH3 expression 2 to 3-fold in (Figure 8A). Similar results were obtained in T47D (supplemental Figure 7) and SKBR3 cells (data not shown, but see supplemental Figure 3 for induction of endogenous RALDH3 expression by transfection with tagged RALDH3). These results suggest the existence of a positive feed-back loop of RALDH3 expression through RA signaling. Consistent with this hypothesis, expression of endogenous RALDH3 in MCF-7 cells was increased by long-term (6 d) treatment of cells with retinol in a dose-dependent manner (Supplemental Figure 7B), suggesting that even the low levels of RALDH3 present in these cells are sufficient for sensitivity to increased retinol concentrations. In addition, levels of SOX9 expression were also raised by retinol treatment in a dose-dependent manner, consistent with induction of RA signaling.

The above-described results indicate that RALDH3 expression is not permanently abolished in luminal cell lines, but is actively repressed. Strikingly, treatment of MCF-7 cells with 17 $\beta$ -estradiol (E2) suppressed basal RALDH3 mRNA levels 2-3 fold after 8, 24 or 48 h treatments (Figure 8A) or 72 h (Fig 8B). In addition, estradiol suppressed RALDH3 induction by RA in a time-dependent manner (Figure 8A-B). Western analysis performed after 72 h treatment confirmed these observations at the protein level (Figure 8C). Although E2 did not significantly inhibit basal RALDH3 expression in T47D cells, it efficiently suppressed RA-induced levels (Supplemental Figure 7A). These results suggest that estrogen signaling protects ER $\alpha$ -positive cells from potential auto- or paracrine effects of RA on RALDH3 expression. Thus, estrogenic blockade therapies should result in increased intratumoral RALDH3 levels. We compared the effect on RALDH3 levels of treatment with the selective estrogen receptor modulator tamoxifen or with the full antiestrogen ICI182,780 (fulvestrant) with those of estrogen deprivation, mimicking aromatase treatment (Figure 8B). The antiestrogens had little effect by themselves in the absence of estrogen, but reversed partially (tamoxifen) or fully (ICI182,780) the suppression of basal RALDH3 expression by estradiol (Figure 8B, compare +E2,Tam 1 $\mu$ M and +E2,ICI 1 $\mu$ M to +E2). On the other hand, tamoxifen unexpectedly had a partial agonist effect in the presence of RA in MCF7 cells, inhibiting RA-induced expression

by 2-fold (Figure 8B, compare +RA,Tam 1 $\mu$ M to +RA). As a result, saturating concentrations of tamoxifen led to a lower level of RALDH3 expression in the presence of E2 and RA (+E2,+RA,Tam 1 $\mu$ M) compared to estrogen withdrawal (-E2,+RA). In contrast, ICI182,780 potentiated the effects of RA in the absence or presence of E2 (Figure 8B, compare +RA, ICI 1 $\mu$ M to +RA).

**RALDH3 is a predictor of recurrence-free survival in breast cancer patients.**

Low expression of RALDH3 in RA-sensitive breast luminal tumor cells could provide a selective advantage in a physiological environment containing retinol, while increased RALDH3 expression upon inhibition of estrogen signaling or synthesis could contribute to inhibition of tumor growth. To determine if RALDH3 expression levels represent a positive prognostic marker in patients with luminal tumors, we classified patients from 3 independent large-scale clinical studies [45-47] in two groups according to RALDH3 mRNA levels. In the three studies, patients with ER $\alpha$ -positive tumors associated with higher expression of RALDH3 (above the median, Figure 9 A-C, blue lines) had a lower risk of distant metastasis compared to patients with lower expression of RALDH3 (Figure 9 A-C, red lines). This correlation did not hold for patients with ER $\alpha$ -negative tumors in the same studies (Figure 9 A and B), suggesting that RALDH3 represents a marker for good prognosis specifically in ER $\alpha$ -positive tumors.



## DISCUSSION

Results presented herein indicate that RALDH3 catalyzes RA synthesis in normal and transformed breast epithelial cells. On the other hand, RALDH2 was expressed to high levels only in one cell line that also expresses RALDH3 and RALDH1 (MDA-MB-468), and no detectable RA synthesizing activity was observed in other cell lines expressing RALDH1 (BT-474, SKBR3, MDA-MB-361). This may result either from RALDH1 protein levels insufficient for RA synthesis and/or from a catalytic efficiency with retinal substrates lower than that of RALDH3. This latter hypothesis is supported by the effects of transient expression of tagged RALDH1 and RALDH3 in SKBR3 and ZR-75 cells, which have low RA-synthesizing activity. Indeed, RALDH3 was more effective than RALDH1 at inducing RA synthesis from retinol present in cell culture medium and expression of the RA target gene SOX9. RALDH1 is used as a marker of both normal and cancer mammary stem cells [31], and may play a role in early differentiation of stem cells as recently proposed for hematopoietic stem cells [33]. However, a major role of RALDH1 in the differentiation of the mouse mammary gland epithelium is unlikely, since deletion of the *Raldh1* gene does not affect viability and fertility [34]. Our observation that RALDH1 is less effective than RALDH3 for RA synthesis in cultured breast cell lines suggests that sequential expression of RALDH1 and RALDH3 during mammary epithelial cell differentiation may result in higher sensitivity to retinol in differentiating cells than in stem cells. In this respect, we note that RALDH3 expression was found to be enriched in luminal-restricted progenitor cells [54]. Patterns of RALDH3 expression observed in the adult mammary gland are consistent with a role predominantly in the luminal lineage.

While RALDH3 is expressed in the luminal epithelium of the adult mammary gland, coinciding with RA synthesis in these cells, its expression is low in luminal breast tumors. As sensitivity to RA in breast cancer cell lines also correlates with the luminal phenotype, this result suggests that low RALDH3 expression is needed for tumor cell proliferation in the presence of retinol. This hypothesis is strongly supported by the observation that overexpression of RALDH3 in sensitive SKBR3

and ZR-75 cells to levels found in normal and immortalized cells led to a marked increase in G0/G1 content and reduced DNA replication, as assessed by FACS analysis and EdU incorporation. Conversely, tumor cells that express RALDH3 and are capable of RA synthesis are not growth-arrested by RA (BT-20 and MDA-MB-468). High RALDH3 levels in tumors may thus be a marker of intrinsic RA resistance, although lack of expression may not necessarily indicate sensitivity to RA (e.g. MDA-MB-231, MDA-MB-361). RALDH3 expression is expected to lead to growth inhibition of neighboring RA-sensitive cells, and thus may even confer a selective growth advantage to expressing RA-resistant tumor cells *in vivo*.

Surprisingly in view of the opposite correlation between RALDH3 expression and sensitivity of breast cancer cell lines to RA, treatment of luminal cells with RA induced RALDH3 transcription. Thus, low RALDH3 expression in luminal cancer cells does not result from loss of RA signaling but may be actively repressed by transcription factors active in luminal tumor cells. Our results indicate that ER $\alpha$  is one of these factors, although probably not the only one as ER $\alpha$ -negative, HER2-positive luminal SKBR3 cells are also RALDH3-low. The observation that RALDH3 expression is repressed by estrogens in ER $\alpha$ -positive cancer cells opens the possibility that RALDH3 expression levels may be modulated during the hormonal cycle in normal ER $\alpha$ -positive luminal cells. In addition, the known overexpression of the aromatase and ER $\alpha$  genes in breast tumors indicates a possible mechanism of escape from the antiproliferative effects of RA production in luminal cells. As estrogens are also known to induce RAR $\alpha$  expression [49-51, 55], active estrogen signaling in luminal tumors may thus coordinate sensitivity to RA but resistance to circulating retinol.

Together, our results indicate a role of RALDH3 expression in RA signaling in the luminal breast epithelial cell lineage and in the control of ER $\alpha$ -positive cell proliferation through autocrine and/or paracrine mechanisms. This proposed role is compatible with the reported observation that the mouse RALDH3 genes is found within a breast tumorigenesis modifier locus, its expression levels correlating with lower susceptibility in p53 heterozygote mouse strains [56]. Low levels of RALDH3 expression and thus of intratumoral RA synthesis in luminal tumors may account for

tumor progression in spite of sensitivity to the antiproliferative effects of RA. Restoration of RALDH3 expression in tumor cells during therapeutic treatments based on estrogenic blockade may thus contribute to therapeutic success if levels of RALDH3 and of retinol in the tumor microenvironment lead to high enough levels of RA synthesizing activity for antiproliferative/apoptotic effects. In this respect, we observed that prolonged exposure to low levels of retinol in the absence of E2 signaling is sufficient to induce endogenous RALDH3 expression and RA signaling in MCF7 cells. Importantly, our observations indicate that RALDH3 expression levels predict longer distant metastasis-free survival in breast cancer patients with ER-positive, but not ER $\alpha$ -negative tumors.

In conclusion, our results indicate that RALDH3 expression has antiproliferative effects in luminal breast epithelial cells through efficient RA synthesis. Its repression by estrogens and possibly other luminal-specific transcription factors is likely a key factor in the proliferation of ER $\alpha$ -positive, RA-sensitive tumor cells in the presence of retinol, and restoration of RALDH3 expression via estrogenic blockade therapies may contribute to good prognosis in luminal tumors.

## **METHODS**

### **Recombinant plasmids**

Mouse RALDH3 and rat RALDH1 cDNAs were inserted in the pCDNA3.1-neo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fused with an adaptor encoding an N-terminal hemagglutinin (HA) tag sequence. Catalytically dead mutants of RALDH1 and RALDH3 were generated by site directed mutagenesis of the catalytic cysteine (C303A for RALDH1 and C314A for RALDH3) using a Quickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

### **Cell culture**

Primary human mammary epithelial cells (HMECs, Lonza, Basel, Switzerland) were maintained in MEGM serum-free medium (Lonza). All cell lines were purchased from American Type Culture Collection ATCC (Manassas, VA, USA). Immortalized 184B5 and MCF-10F cell lines were maintained in DMEM/Ham's F-12 medium (50:50 mix, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 1% penicillin/streptomycin (Wisent), 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Wisent), cholera toxin (Sigma-Aldrich; 1 ng/ml for 184B5, 100 ng/ml for MCF-10F) and 10 ng/ml EGF (Wisent). Transformed MCF-7, SKBR3, BT-474, T47D, and ZR-75 cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. MDA-MB-231 and HeLa cells were maintained in the same medium except that 5% FBS was used. BT-20 were maintained in  $\alpha$ -MEM (Wisent) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (Wisent). MDA-MB-361 and MDA-MB-468 cells were maintained in Leibovitz's L15 medium (Wisent) supplemented with 20% or 10% FBS, respectively, and 1% penicillin/streptomycin.

### ***In vivo* metabolism assays**

Cell lines or electroporated SKBR3 cells were plated and maintained in their respective media until near-confluence. All cells were switched 24 h before treatment to DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. Cells were

treated with 2  $\mu$ M retinol (Sigma-Aldrich) or vehicle (DMSO, final dilution 1:1000) for 18 h. At the end of the incubation period, aliquots (400  $\mu$ l) of media were collected from each treated plate and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  in borosilicate tubes (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). To extract retinoids, frozen aliquots were incubated with 400  $\mu$ l of butanol/acetonitrile (50:50 mix, Sigma-Aldrich) until totally thawed and quickly vortexed. After addition of 40  $\mu$ l of 10M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and vortexing, the tubes were centrifuged 15 min (3,500 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatants (100  $\mu$ l) were analyzed by reverse phase HPLC using a Shimadzu LC10-ADVP equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling system (Man-Tech, Guelph, ON, Canada) and a 10-ODS (250x4,5mm) analytical column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Retinoids were eluted with a mobile phase (acetonitrile 65%/water 35%, 10 mM ammonium acetate) at a flow rate of 1.2 ml/min. Retinoids were detected with a photodiode array detector (Shimadzu model SPD-M10 AVP).

### **Preparation of protein extracts**

For *in vitro* enzymatic assays and Western analysis of untreated cells, cells were maintained in their respective media until near-confluence and switched to DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin 24 h before harvest. For analysis of hormonal regulation of RALDH3 expression, cells grown in their regular medium (DMEM with 10% FBS) were switched to DMEM supplemented with 10% charcoal-treated FBS 3 days before treatment. Cells (2,5 million per 10 cm Petri dish) were treated for different times with 17- $\beta$ -estradiol (E2, 5 or 25 nM, Sigma-Aldrich), retinoic acid (RA, 100 nM, Sigma-Aldrich), 4-hydroxy-tamoxifen (Tam, 100 nM or 1  $\mu$ M, Sigma-Aldrich) or ICI182,780 (ICI, 100 nM or 1  $\mu$ M, Sigma-Aldrich). For analysis of overexpressed RALDH enzyme levels and effects on SOX9 protein, electroporated cells (see below) were seeded in 10 cm plates in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and treated or not with RA (100 nM). Cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and were collected in ice-cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 5% glycerol) supplemented with 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors (all from Sigma-Aldrich).

Cells were incubated 10 min at 4°C and sonicated 3 min (maximal intensity, three on/off cycles) on a Bioruptor (Diagenode, Sparta, USA) followed by centrifugation at 16,200 g for 15 min. Protein concentrations in supernatants were quantified following the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

#### ***In vitro* enzymatic assays.**

Enzymatic assays were performed with 50 µg of whole cell protein extracts in 250 µl reaction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.02% Tween 20, 600 µM NAD<sup>+</sup>, 1 mM dithiothreitol) containing all-*trans* retinal (10 µM, Sigma-Aldrich). All assays were performed for 30 min at 37°C in triplicates. The reaction was stopped by freezing in an ethanol/dry ice bath. Retinoids were extracted by addition of butanol/acetonitrile (50:50 mix, 400 µl) to frozen reactions. Tubes were incubated at room temperature until complete thawing and were centrifuged (3,500 g for 15 min). Supernatants (20 µl) were analyzed by reverse phase HPLC for RA quantification as described above.

#### **Western blot analysis**

Protein extracts were separated by electrophoresis on an SDS-polyacrylamide gel (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA). Membranes were blotted with antibodies directed against RALDH1 (ALDH, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada), RALDH3 (ALDH1A3, C13, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), SOX9 (AB5535, Millipore, Temecula, CA, USA), the HA tag (12CA5, Santa Cruz Biotechnology) or β-Actin (A-5441, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies (anti mouse-HRP, anti-goat-HRP and anti rabbit-HRP) were purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada).

#### **RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR:**

For analysis of RALDH expression patterns, of hormonal regulation of RALDH3 expression, and of RA target gene expression in cells transfected with RALDH expression vectors, cells were plated and treated as described for preparation of protein extracts. Cells were harvested after removal of the culture medium in 1 ml of

TRI-Reagent (Sigma-Aldrich). Total RNAs were extracted and 2  $\mu$ g were reverse-transcribed using the RevertAid H first minus strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, Burlington, ON, Canada) as recommended by the manufacturers. Reverse transcription products were diluted 10 times in water prior to real-time quantitative PCR. Gene expression levels were determined using primer and probe sets from the Universal Probe Library (Roche Diagnostic, Laval, Que, Canada).

### **Gene expression profiling analysis**

For analysis of Agilent arrays from the UNC microarray database, Loess normalization was performed on background-subtracted intensities. Flagged values were removed, data were log<sub>2</sub> transformed and median-centered for each gene across samples. For Affymetrix arrays (Acc. numbers ArrayExpress E-TABM-157 and GEO database GSE16795, [46, 47]), RMA normalization and median-centering for each gene were performed. Breast tumor subtypes (luminal A, luminal B, HER2+, basal-like or normal-like) were determined using the nearest centroid method applied to the PAM50 gene set [48] using Spearman correlation as distance. Luminal A/B tumors were grouped and normal-like tumors and metastases excluded for better comparison with results from the tissue microarrays.

### **Tissue staining and immuno-histochemistry**

All cell samples, mouse and human tissue samples (obtained in accordance with ethics protocols approved by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal and the Comité d'Ethique de la Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal) were formalin fixed and paraffin embedded at the IRIC histology core facility (IRIC, Montreal, QC, Canada). For staining, deparaffinization and antigen retrieval were performed using a Discovery XT automatic stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) using protocols recommended by the manufacturer. Primary antibodies used were directed against RALDH1 (ALDH, BD Biosciences, 1:50 dilution for 60 min at room temperature), RALDH3 (C-13, Santa Cruz Technologies, 1:50 dilution for 3 h at room temperature), ER $\alpha$  (SP1, Ventana Medical Systems, undiluted, 32 min at 37°C),  $\beta$ -gal

antibody (AbCam, 1:500 dilution for 1 h at room temperature). Primary antibody incubation was followed by incubation with appropriate biotin conjugated secondary antibodies (1:100 dilution, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA). For staining, streptavidin-horseradish peroxidase, and 3,3 diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DABmap detection Kit, Ventana Medical Systems). The sections were then counterstained with Gill hematoxylin and a bluing reagent was applied for postcounterstaining. Sections were scanned at X40 magnification using the C9600 NanoZoomer System (Hamamatsu Corporation, Bridgewater, NJ, USA), which can adjust focus on any part of the slide. NDP Scan software (version 2.2.17) was used to visualize virtual slides and extract images. For double staining, the first staining was performed using the RALDH3 antibody as for single staining but was followed by a denaturation step (90°C, 4 min) before ER $\alpha$  staining with the REDmap detection Kit (Ventana Medical Systems) according to the manufacturer's instructions.

### **Tissue microarrays**

Tissue samples from 140 patients with invasive breast carcinoma were fixed in formalin and embedded in paraffin. The patient's age and pathologic parameters including tumor size, lymph node status, histological subtype, histological grade, nuclear grade, mitotic grade and SBR-EE grade were also recorded. The ER/PR and HER2 status of each specimen were used for classification of tumors as ER $\alpha$ -positive (ER $\alpha$ +), HER2-positive (HER2+) or triple-negative (Triple neg.). Tissue cylinders with a diameter of 1 mm were punched from each donor tissue block and three cylinders were arrayed for each sample in order to minimize tissue loss and to overcome tumor heterogeneity. All immunohistochemically-stained samples (see above) were scored independently by two pathologists. Sections were scanned at X40 magnification using the C9600 NanoZoomer System. NDP Scan software (version 2.2.17) was used to visualize virtual slides and extract images. RALDH3 staining was interpreted using a grading scale of 0-4 according to intensity of staining using a scale established by initial classification of degrees of expression in different tumors This



scoring was performed on each of the triplicate samples. Averages were then calculated for each tumor and for each class of tumors.

### **Growth assays**

Cells were seeded at low density in their respective media supplemented with charcoal-treated FBS. In addition, EGF supplementation was omitted for 184B5 and MCF-10F cell lines. Cells were treated at days 0, 2, 4, 6 with vehicle (DMSO, 1:1000 dilution), retinol (100 nM) or all-*trans* RA (100 nM). After 9 days cells were collected and protein concentrations were quantified by DC protein assay (Life Science, Mississauga, ON, Canada).

### **Colony formation assay:**

MCF-7 cells were adapted to grow in serum free HL-1 medium (Lonza) for one week and were infected with pMSCV-puro-CMV-HA retroviruses expressing RALDH3 or its inactive mutant RALDH3 C314A. Infected cells were then selected with puromycin for 3 d. Stably-expressing cells were seeded at low density (2000 cells per well in 6-well plates) in DMEM supplemented with 10% serum, grown 10 days in the presence of retinol or RA (100 nM each) and stained with crystal-violet (Sigma-Aldrich). Treated media were replaced every second day.

### **Cell cycle analysis of RALDH1- and RALDH3-expressing cells**

SKBR3, ZR-75 and MDA-MB-231 cells were electroporated (5 million cells, 240 V, 950  $\mu$ F for SKBR3, 1000  $\mu$ F for ZR-75 and 975  $\mu$ F for MDA-MB-231) with either the parental pCDNA3.1-neo vector or vectors expressing HA-tagged RALDH1, RALDH3 or their respective catalytically inactive mutants, together with a ten-fold lower amount of an expression vector for membrane-targeted EGFP (pEGFP-spectrin, [57]). Cells were seeded in 10 cm plates in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin and left untreated or treated with retinol or RA at indicated concentrations. After 72 h cells were trypsinized and a fraction of transfected cells were collected in lysis buffer for western analysis using a monoclonal antibody against the HA tag. The remaining transfected cells were fixed

in 70% ethanol, stained with propidium iodine (Sigma-Aldrich) and analyzed on a Canto flow cytometer (BD Biosciences). At least 20,000 GFP-positive cells were used for each condition for cell cycle profile analysis with ModFit LT 3.2 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

### **5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation assays**

SKBR3 cells were transfected by electroporation as described above. Cells were seeded in 96-well plates (20,000 cells/well) and treated or not for 48 h with all-*trans* RA (1  $\mu$ M). Proliferation assays were performed using a Click-iT™ EdU Alexa Fluor High-Throughput Imaging (HCS) Assay (Invitrogen) according to the supplier's protocols after incubating cells with EdU (10  $\mu$ M) for 2 h. Images were captured using ImageXpressMicro and analyzed with MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Statistical analysis**

For FACS analysis and EdU assays, a two sample t test was used to assess difference in number of cells in G0/G1 phase and EdU-positive cells. For RNA expression profile analysis, an ANOVA test was performed to determine whether RALDH3 mRNA expression was significantly different between class of tumors (Luminal, HER2+, Basal) and a Scheffe test to investigate the statistical significance of individual comparisons. A P-value < 0.05 was considered significant. For tissue microarray analysis, a  $\chi^2$  contingency test with a Yates correction was used to determine the association between tumor types and patient IHC scores. A P-value < 0.05 was considered significant. All statistical procedures (two-sample t test,  $\chi^2$  test, ANOVA test and Scheffe test) were performed in the open-source R statistical environment (<http://www.r-project.org>).

**ACKNOWLEDGMENTS:**

The authors gratefully acknowledge the excellent technical support of Julie Hinsinger, Micheline Fortin and Mélina Narlis from the IRIC histology platform, Danièle Gagné from the IRIC flow cytometry platform, Raphaëlle Lambert from the IRIC genomic Platform and Christian Charbonneau from the IRIC imagery platform. IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research (CECR), the Canada Foundation for Innovation (CFI), and the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MP and MR were supported by studentships from the Faculté des Études Supérieures at Université de Montréal. MR and NH were supported by a studentship and post-doctoral fellowship, respectively, from the Montreal Center for Experimental Therapeutics in Cancer. SM is recipient of a Chercheur Boursier National salary award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-81319) to PVB and SM.

**REFERENCES:**

1. Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon, *Function of retinoic acid receptors during embryonic development*. Nucl Recept Signal, 2009. **7**: p. e002.
2. Wolbach, S.B. and P.R. Howe, *Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin*. J Exp Med, 1925. **42**(6): p. 753-777.
3. Wald, N., et al., *Low serum-vitamin-A and subsequent risk of cancer. Preliminary results of a prospective study*. Lancet, 1980. **2**(8199): p. 813-5.
4. Kark, J.D., et al., *Serum vitamin A (retinol) and cancer incidence in Evans County, Georgia*. J Natl Cancer Inst, 1981. **66**(1): p. 7-16.
5. Clarke, N., et al., *Retinoids: potential in cancer prevention and therapy*. Expert Rev Mol Med, 2004. **6**(25): p. 1-23.
6. Sun, S.Y. and R. Lotan, *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **41**(1): p. 41-55.
7. Freemantle, S.J., M.J. Spinella, and E. Dmitrovsky, *Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7305-15.
8. Lacroix, A., C. Doskas, and P.V. Bhat, *Inhibition of growth of established N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer in rats by retinoic acid and ovariectomy*. Cancer Res, 1990. **50**(18): p. 5731-4.
9. Lotan, R., *Retinoids in cancer chemoprevention*. Faseb J, 1996. **10**(9): p. 1031-9.
10. Armstrong, J.L., C.P. Redfern, and G.J. Veal, *13-cis retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology--is changing shape the key to success?* Biochem Pharmacol, 2005. **69**(9): p. 1299-306.
11. Mangelsdorf, D.J., et al., *Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid*. Genes Dev, 1992. **6**(3): p. 329-44.
12. Leid, M., P. Kastner, and P. Chambon, *Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(10): p. 427-33.

13. Giguere, V., *Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(1): p. 61-79.
14. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. *Cell*, 1995. **83**(6): p. 835-9.
15. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. *Faseb J*, 1996. **10**(9): p. 940-54.
16. Napoli, J.L., *Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1440**(2-3): p. 139-62.
17. Napoli, J.L., et al., *Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans-retinoic acid in human plasma*. *J Lipid Res*, 1985. **26**(3): p. 387-92.
18. Petkovich, P.M., *Retinoic acid metabolism*. *J Am Acad Dermatol*, 2001. **45**(5): p. S136-42.
19. Vasiliou, V., et al., *Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping*. *Pharmacogenetics*, 1999. **9**(4): p. 421-34.
20. Duester, G., F.A. Mic, and A. Molotkov, *Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid*. *Chem Biol Interact*, 2003. **143-144**: p. 201-10.
21. Niederreither, K., et al., *Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development*. *Nat Genet*, 1999. **21**(4): p. 444-8.
22. Mic, F.A., et al., *Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of *Raldh2* null mutant mice*. *Development*, 2002. **129**(9): p. 2271-82.
23. Dupe, V., et al., *A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(24): p. 14036-41.

24. Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duester, *Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning*. *Development*, 2006. **133**(10): p. 1901-10.
25. Fan, X., et al., *Targeted disruption of Aldh1a1 (Raldh1) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(13): p. 4637-48.
26. Matt, N., et al., *Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells*. *Development*, 2005. **132**(21): p. 4789-800.
27. Xi, J. and Z. Yang, *Expression of RALDHs (ALDH1As) and CYP26s in human tissues and during the neural differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cell*. *Gene Expr Patterns*, 2008. **8**(6): p. 438-42.
28. Armstrong, L., et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1142-51.
29. Corti, S., et al., *Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity*. *Stem Cells*, 2006. **24**(4): p. 975-85.
30. Hess, D.A., et al., *Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells*. *Blood*, 2006. **107**(5): p. 2162-9.
31. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(5): p. 555-67.
32. Charafe-Jauffret, E., et al., *Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature*. *Cancer Res*, 2009. **69**(4): p. 1302-13.
33. Chute, J.P., et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(31): p. 11707-12.

34. Levi, B.P., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems*. *Blood*, 2009. **113**(8): p. 1670-80.
35. Berard, J., et al., *Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene*. *Faseb J*, 1996. **10**(9): p. 1091-7.
36. Miller, W.H., Jr., *The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer*. *Cancer*, 1998. **83**(8): p. 1471-82.
37. Kim, H., et al., *The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2005. **65**(18): p. 8118-24.
38. Bhat, P.V. and A. Lacroix, *Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats*. *Cancer Res*, 1989. **49**(1): p. 139-44.
39. Mira, Y.L.R., et al., *Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells*. *J Cell Physiol*, 2000. **185**(2): p. 302-9.
40. Hayden, L.J. and M.A. Satre, *Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2002. **72**(2): p. 95-105.
41. Rexer, B.N., W.L. Zheng, and D.E. Ong, *Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7065-70.
42. Sima, A., et al., *Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(12): p. 1660-4.
43. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 515-27.
44. U.N.C, *microarray database: <https://genome.unc.edu>*.
45. Chang, H.Y., et al., *Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(10): p. 3738-43.

46. Chin, K., et al., *Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 529-41.
47. Loi, S., et al., *Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen*. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 239.
48. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
49. van der Burg, B., et al., *Retinoic acid resistance of estradiol-independent breast cancer cells coincides with diminished retinoic acid receptor function*. *Mol Cell Endocrinol*, 1993. **91**(1-2): p. 149-57.
50. van der Leede, B.J., et al., *Retinoic acid receptor alpha 1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells*. *Mol Cell Endocrinol*, 1995. **109**(1): p. 77-86.
51. Raffo, P., et al., *Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines*. *Anticancer Res*, 2000. **20**(3A): p. 1535-43.
52. Grunt, T.W., et al., *An EGF receptor inhibitor induces RAR-beta expression in breast and ovarian cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(4): p. 1253-9.
53. Afonja, O., et al., *RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition*. *Oncogene*, 2002. **21**(51): p. 7850-60.
54. Raouf, A., et al., *Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(1): p. 109-18.
55. Laganier, J., G. Deblois, and V. Giguere, *Functional genomics identifies a mechanism for estrogen activation of the retinoic acid receptor alpha1 gene in breast cancer cells*. *Mol Endocrinol*, 2005. **19**(6): p. 1584-92.
56. Koch, J.G., et al., *Mammary tumor modifiers in BALB/cJ mice heterozygous for p53*. *Mamm Genome*, 2007. **18**(5): p. 300-9.



57. Kalejta, R.F., T. Shenk, and A.J. Beavis, *Use of a membrane-localized green fluorescent protein allows simultaneous identification of transfected cells and cell cycle analysis by flow cytometry*. *Cytometry*, 1997. **29**(4): p. 286-91.

## Figure legends

**Figure 1.** Sensitivity to the antiproliferative effects of RA correlates with low retinal dehydrogenase activity in breast tumor cells. **(A)** *In vitro* RA synthesis from retinal directed by protein extracts from normal, immortalized and transformed breast cell lines. RA concentrations were measured after *in vitro* incubation of equal amounts of protein extracts from the indicated cell lines with all-trans retinal (10  $\mu$ M) at 37°C. Results of one of two experiments are shown. Error bars indicate the standard error of the mean (SEM) of triplicate measurements. **(B)** Synthesis of RA from retinol in cultured cells. RA concentrations were measured by HPLC in the culture medium of cells incubated with retinol (2  $\mu$ M) for 18 hours. RA peaks (validated by spectrum analysis) are indicated on the HPLC profiles. Results of one of two experiments are shown. **(C)** Effect of RA treatment (100 nM) on proliferation of breast cell lines maintained in their respective media over 9 days. Protein concentrations in whole cell extracts were measured by Lowry assay. EGF supplementation was omitted from the media of immortalized cells to reveal RA sensitivity. Results are expressed as percentage of growth in the vehicle-treated cells for each line. Error bars indicate the SEM of triplicate measurements.

**Figure 2.** Expression of RALDH3 correlates with retinal dehydrogenase activity. **(A-C)** Quantitative PCR of reverse transcribed mRNAs from normal, immortalized or transformed mammary epithelial cells. Primer pairs specific to human RALDH1 **(A)**, RALDH2 **(B)** or RALDH3 **(C)** were used and signals were normalized to expression of the house-keeping gene  $\beta$ -Actin. Error bars indicate the SEM of triplicate measurements in one of two experiments. **(D)** Western analysis of expression of RALDH1 and 3 using monoclonal antibodies (ab) directed against human RALDH1 or RALDH3. Equal amounts of whole cell extracts (20  $\mu$ g) were loaded on a 10% polyacrylamide-SDS gel and levels of  $\beta$ -Actin were monitored as internal reference (HMEC P1 and HMEC P2: HMEC cells at passage 1 and at passage 2). Similar results were obtained in two experiments.

**Figure 3.** RALDH3 expression and RA signaling overlap in normal mouse luminal breast epithelium **(A)** Expression of RALDH3 and  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) were determined by Immuno histochemistry (IHC) using an anti-RALDH3 (as in Fig. 2) or an anti- $\beta$ -gal mAb in consecutive sections of RARE-hspLacZ mouse mammary tissue (brown stain, see arrows). Scale bars represent 200 $\mu$ m. **(B)** Expression of smooth muscle actin (SMA, red stain, see red arrows) was detected by co-staining with RALDH3 or  $\beta$ -gal in the mammary tissue of RARE-hspLacZ mice (RALDH3 or  $\beta$ -gal: brown stain, see black arrows). Scale bars represent 100  $\mu$ m.

**Figure 4.** RALDH3 is expressed predominantly in human ductal luminal breast epithelium. **(A-B)** Expression of RALDH3 in human mammary tissue was determined by IHC using an anti-RALDH3 mAb (brown stain, see arrows) in sections of normal tissue adjacent to an ER $\alpha$ -positive tumor **(A)** and of 2 different regions of a breast reduction mammoplasty sample **(B)**. Scale bars represent 100  $\mu$ m **(A)** and 200  $\mu$ m **(B)**.

**Figure 5.** Absence of RALDH3 expression in an ER $\alpha$ -positive but not ER $\alpha$ -negative tumor. **(A)** RALDH3 and ER $\alpha$  levels were detected by IHC in 2 consecutive sections of an ER $\alpha$ -positive tumor sample using an anti-RALDH3 Ab (brown stain, right panel, see black arrows for examples) or an anti-ER $\alpha$  mAb (brown stain, left panel, see red arrows for regions of RALDH3 expression). Two different regions are shown in a synchronized view of the 2 stained sections. **(B)** Expression of RALDH3 and ER $\alpha$  were detected by costaining of a single section of an ER $\alpha$ -positive tumor sample using an anti-RALDH3 mAb (brown stain, see arrows for examples) or an anti-ER $\alpha$  mAb (red stain). **(C)** Expression of RALDH3 was detected by IHC in an ER $\alpha$ -negative tumor sample using an anti-RALDH3 mAb (brown stain, see arrows for examples). Scale bars represent 100  $\mu$ m **(A-B)** and 200  $\mu$ m **(C)**.

**Figure 6.** Low RALDH3 levels in ER $\alpha$ -positive tumors. **(A)** RALDH3 (ALDH1A3) mRNA levels are low in luminal breast tumors. Box-plot representation of ALDH1A3 levels in 4 breast tumor transcriptional profiling studies. RALDH3 levels

were lower in luminal versus HER2+ and/or basal tumors (Scheffe test:  $p < 0.0005$  in all graphs). **(B-E)** Paraffin-embedded formalin-fixed sections of breast tissue arrays containing triplicate samples from 140 patients were stained with an anti-RALDH3 mAb. Results were scored from 0 to 4 according to intensity of staining using a scale established by initial classification of expression in all tumors **(B)**. The average scores in the three types of breast tumors are shown **(C)**. The p-value of the Chi-squared test for the association of luminal subtype with low RALDH3 (score $<2$ ) is 0.000216. Histogram and pie chart representations of the distributions of scores by tumor type are also shown **(D-E)**. The ceilings of the median scores of the three core biopsies were plotted for each sample.

**Figure 7.** Active RALDH3 restores RA synthesis and prevents proliferation of SKBR3 cells more efficiently than active RALDH1. **(A)** Western analysis of HA-tagged wild type (WT) or inactive RALDH mutants, SOX9 or  $\beta$ -Actin levels in transiently transfected SKBR3 cells using indicated Ab. **(B)** HPLC analysis of RA production from retinol in the culture medium of SKBR3 cells transiently expressing RALDH or inactive mutants. **(C)** G0/G1 fraction in transiently transfected SKBR3 cells expressing RALDH or inactive mutants with or without RA treatment, as determined by FACS analysis. Error bars indicate the SEM of measurements in 3 independent experiments. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , two-sample t-test. **(D)** SKBR3 cells were transfected with the parental vector or with the same vector expressing HA-tagged RALDH3 or its inactive mutant. Cells were seeded in 96-well plates and treated or not for 48 h with RA (1  $\mu$ M), and then with EdU (10  $\mu$ M) for 2 h. Cells were fixed, permeabilized, and incorporated EdU was detected by a fluorescent-azide coupling reaction. Cells were counterstained with Hoechst. EdU/Hoechst staining ratios are shown; error bars indicate the SEM of measurements in two independent experiments. \* $p < 0.05$ , two-sample t-test. **(E)** Representative pictures of the different transfection/treatment conditions. Scale bars represent 50 $\mu$ m.

**Figure 8.** RALDH3 expression is induced by RA and repressed by estradiol in MCF-7 cells. **(A-B)** Quantitative PCR analysis of RALDH3 expression in MCF-7 cells. Cells maintained 4 days before treatment in phenol-red free DMEM medium supplemented with 10% charcoal-treated FBS were treated for indicated time periods **(A)** or for 72 h **(B)** with estradiol (E2 25 nM in A, 5 nM in B), retinoic acid (RA, 100 nM), antiestrogens tamoxifen (Tam) and ICI 182,780 (ICI) or combinations thereof. For cells treated for 48 and 72 h, treatments and medium were replaced every day. Error bars represent the SEM of triplicates in one of two experiments. **(C)** Representative immunoblot demonstrating regulation of RALDH3 expression by RA and E2 in MCF-7 cells after 72 h treatment with (RA 100 nM, E2 25 nM). Three experiments were performed with similar results.

**Figure 9.** Expression level of RALDH3 in tumors predicts distant metastasis-free survival in breast cancer patients. Patients from 3 independent large-scale clinical studies (A, B, C) containing a large number of ER $\alpha$ -positive tumors with associated transcriptional profiles were divided into 2 groups based on median expression of RALDH3. Kaplan-Meier curves for emergence of distant metastases were computed based on provided patient history in these two groups (high expression of RALDH3: blue lines; low expression: red lines). One-sided p-values and Cox hazard ratios (HR) between the 2 groups are shown.

**Supplemental Figure 1.** Specificity of antibodies against RALDH1 or RALDH3 under IHC conditions. HeLa cells were transfected with plasmids expressing either human RALDH1, RALDH2, RALDH3 or with the parental vector (0). Formalin-fixed paraffin-embedded pellets of transfected cells were stained with the anti-RALDH1 or anti-RALDH3 Ab as in figure 3-6, demonstrating the specificity (stained cells appear in dark brown, see arrows for examples). Scale bars represent 100  $\mu$ m.

**Supplemental Figure 2.** Expression pattern of RALDH1 in the mammary gland **(A)** RALDH1 expression was monitored in normal mammary tissue of RARE-hspLacZ mice and in normal human mammary tissue **(B)** using the same anti-RALDH1 Ab used in figure 2D (see arrows for examples). Scale bar represent 100  $\mu\text{m}$  **(A)** or 200  $\mu\text{m}$  **(B)**.

**Supplemental figure 3.** RALDH3 expression levels in transfected SKBR3 and ZR-75 cells are comparable to endogenous levels in immortalized non-tumorigenic 184B5 cells. SKBR3 and ZR-75 cells were transfected as for FACS analysis. RALDH3 expression in transiently transfected SKBR3, ZR-75 and in non-tumorigenic 184B5 cells was compared by western blot analysis using the anti-RALDH3 mAb as in Figure 2D. Note the presence of a faster migrating band in SKBR3 cells transfected with WT RALDH3, corresponding to endogenous RALDH3.

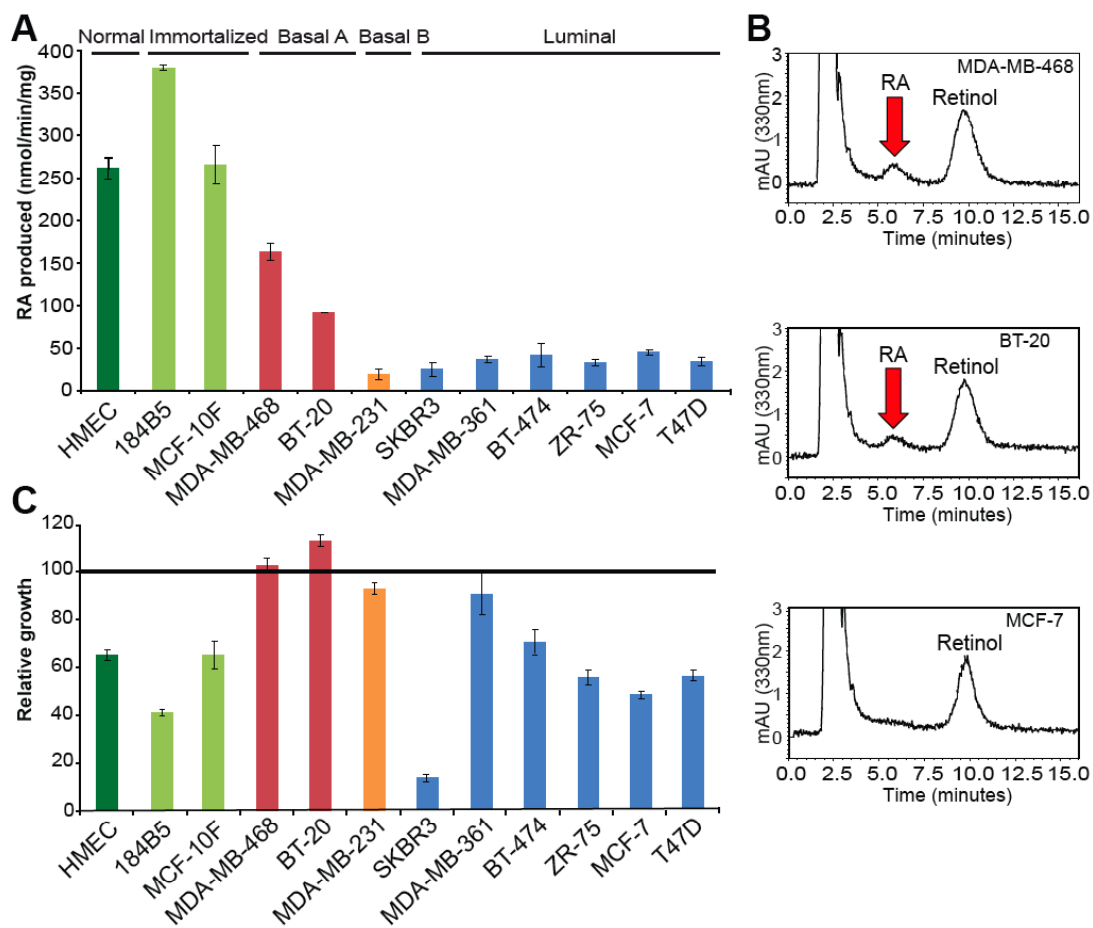
**Supplemental Figure 4.** RALDH3 expression induces the expression of known RA target genes. **(A)** Q-PCR analysis of 4 known RA target genes (SOX9, CYP26A1, FOXA1 and RAR $\beta$ 2) in SKBR3 cells transiently expressing similar levels of HA-tagged RALDH1, RALDH3 and of their respective catalytically-inactive mutants. **(B)** Western blot analysis of the expression of HA-tagged RALDHs and of the RA target gene SOX9 in transfected SKBR3 cells.

**Supplemental Figure 5.** RALDH3 restores RA synthesis and increases the G0/G1 fraction in ZR-75 cells more efficiently than RALDH1. **(A)** Western analysis of RALDH and SOX9 expression in transiently transfected ZR-75 cells, in the absence or presence of added RA (1  $\mu\text{M}$ ) Retinol (Rol 100 nM) or vehicle. SOX9 levels are induced by RA or RALDH expression. RALDH3 is more efficient than RALDH1, while catalytically inactive mutants do not significantly modulate SOX9 expression. **(B)** G0/G1 fraction in parental or transiently transfected ZR-75 cells expressing RALDH1, RALDH3 or their catalytically inactive mutants in the absence or presence of retinol or RA, as determined by FACS analysis. Error bars represent the SEM of

measurement on three independent experiments. (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.005$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , two-sample t-test).

**Supplemental figure 6.** Expression of RALDH3, but not of the catalytically inactive RALDH3 mutant C314A, suppresses colony formation in MCF-7. **(A)** Colony formation assay with MCF-7. Cells were infected with a retroviral vector (pMSCV-CMV) expressing RALDH3, RALDH3 C314A or the parental vector and were selected with puromycin in serum-free medium. Cells were seeded at low density (2000 cells per well) and colonies were grown with retinol (Rol, 100 nM) or RA (100 nM) and stained with crystal violet after 10 days. Treated media were renewed every 2 d. **(B)** Representative immunoblot showing expression levels of WT and mutant RALDH3 in transduced MCF-7 cells.

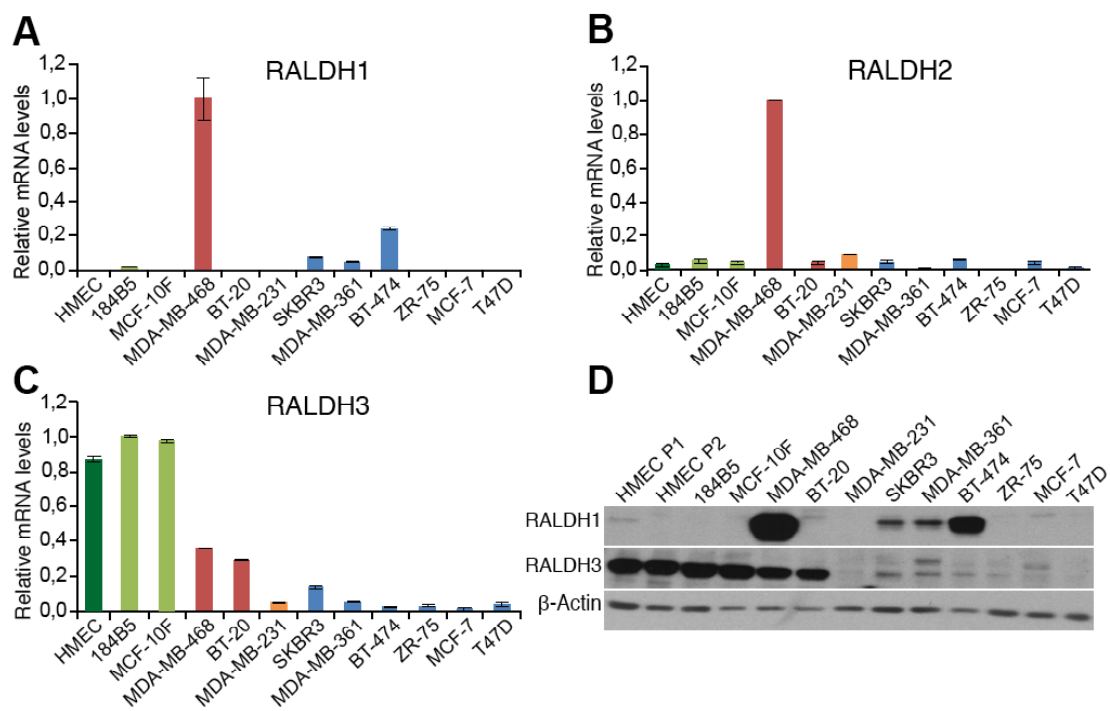
**Supplemental Figure 7.** RALDH3 expression is induced by retinoids and repressed by E2 in luminal cells. **(A)** Quantitative PCR analysis of RALDH3 expression in MCF-7 and T47D luminal cells treated for 72h with retinoic acid (RA, 100 nM), estradiol (E2, 25 nM), or both. Treatments and medium were replaced every day. **(B)** Quantitative PCR analysis of RALDH3 and SOX9 expression in MCF-7 treated for 6 days with increasing concentrations of retinol. Error bars represent the SEM of triplicate measurements.



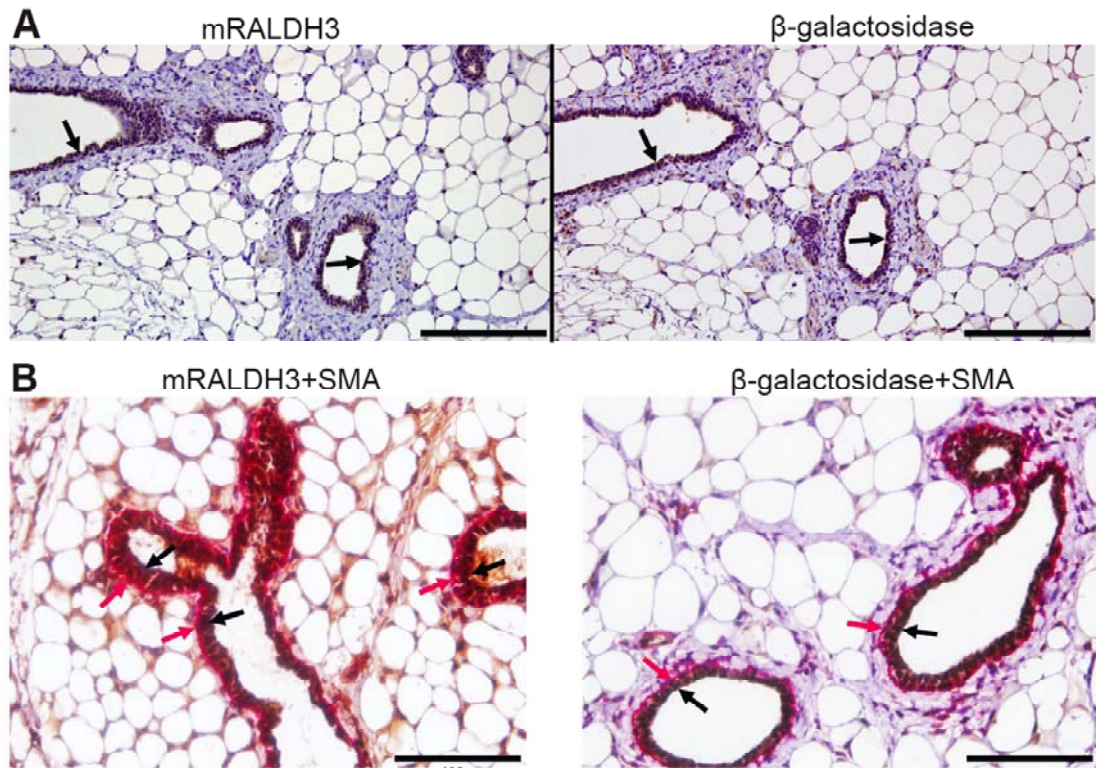
**Figure 1**

Sensitivity to the antiproliferative effects of RA correlates with low retinal dehydrogenase activity in breast tumor cells.



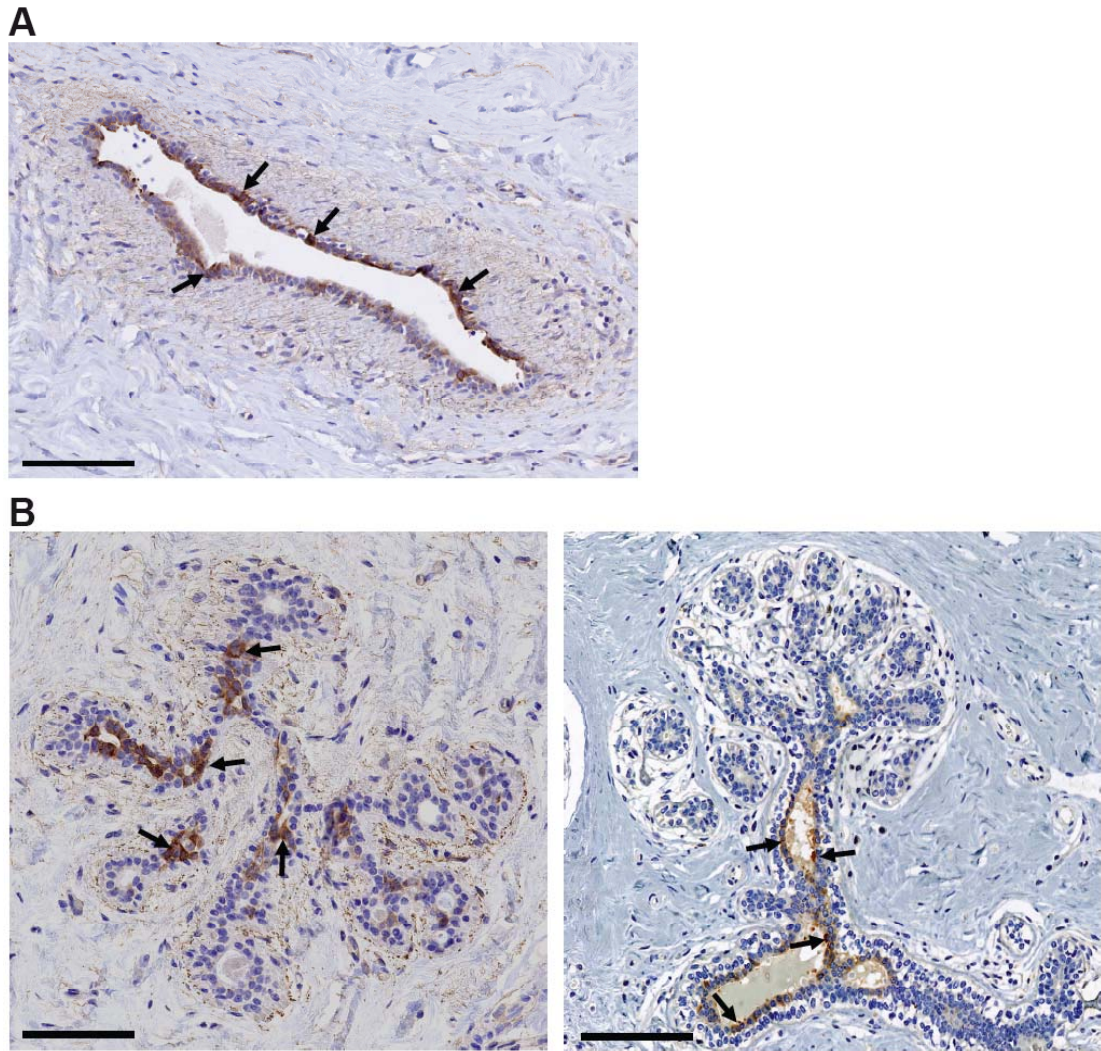
**Figure 2**

Expression of RALDH3 correlates with retinal dehydrogenase activity.



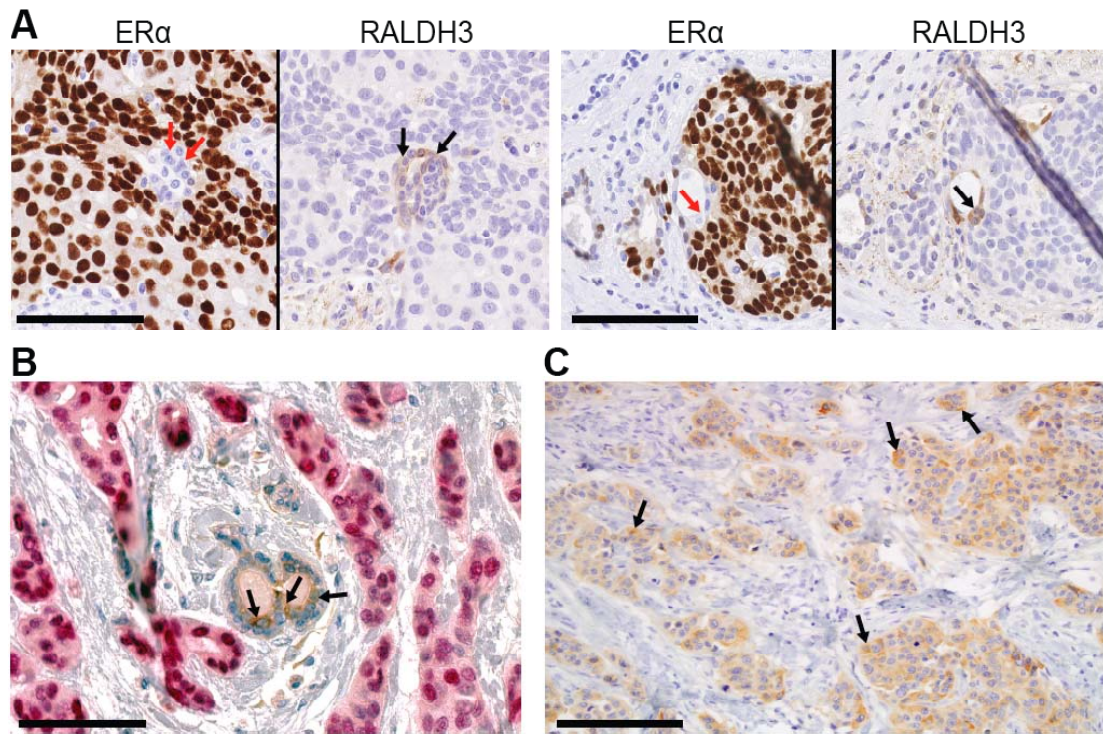
**Figure 3**

RALDH3 expression and RA signaling overlap in normal mouse luminal breast epithelium



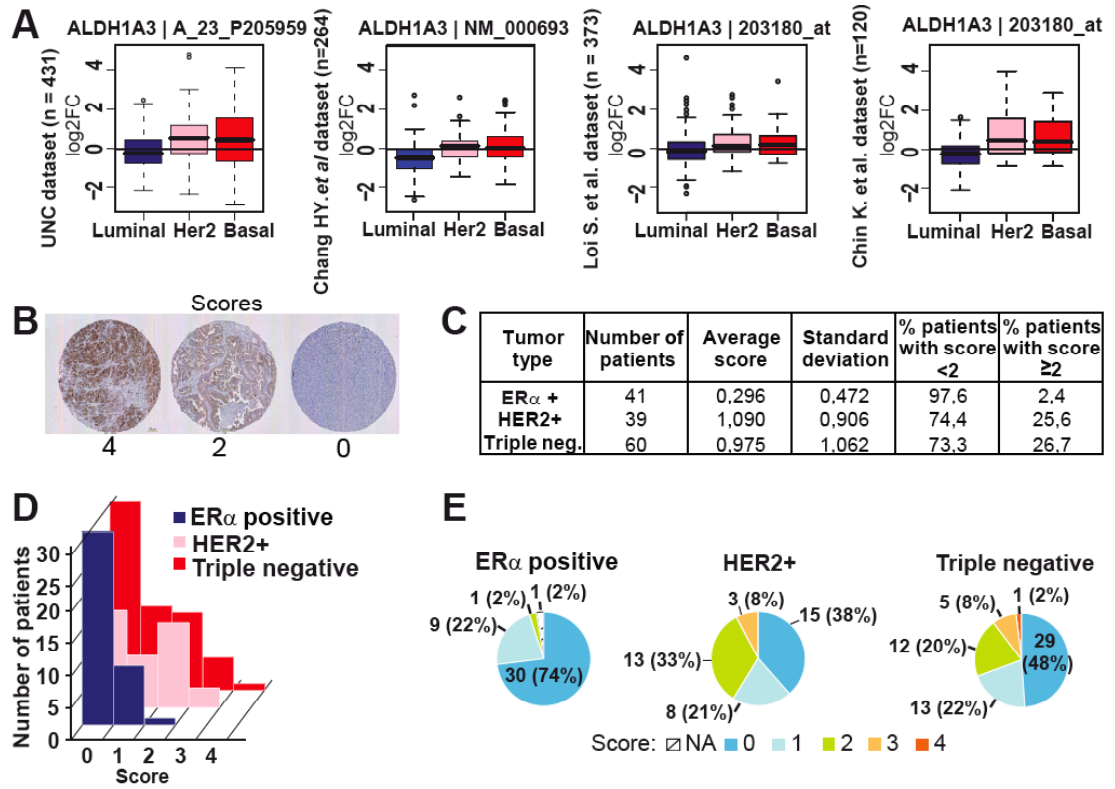
**Figure 4**

RALDH3 is expressed predominantly in human ductal luminal breast epithelium.



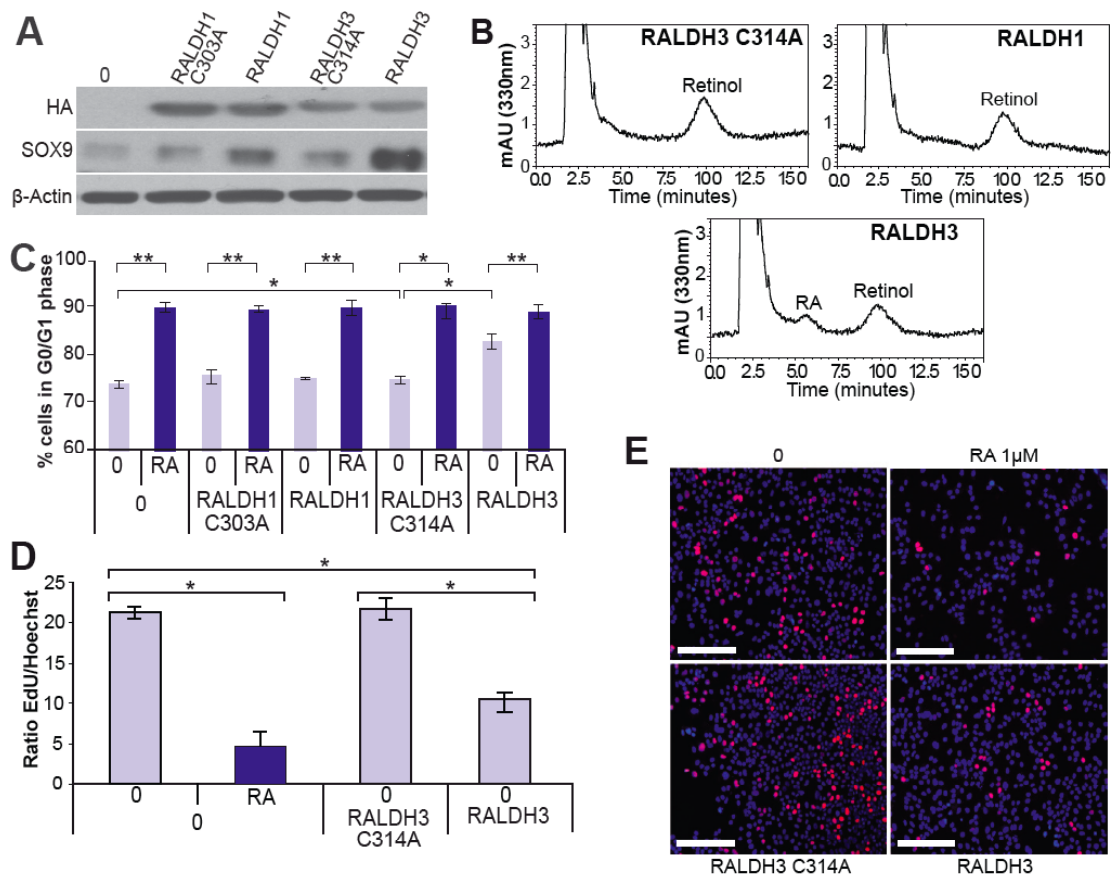
**Figure 5**

Absence of RALDH3 expression in an ERα-positive but not ERα-negative tumor.



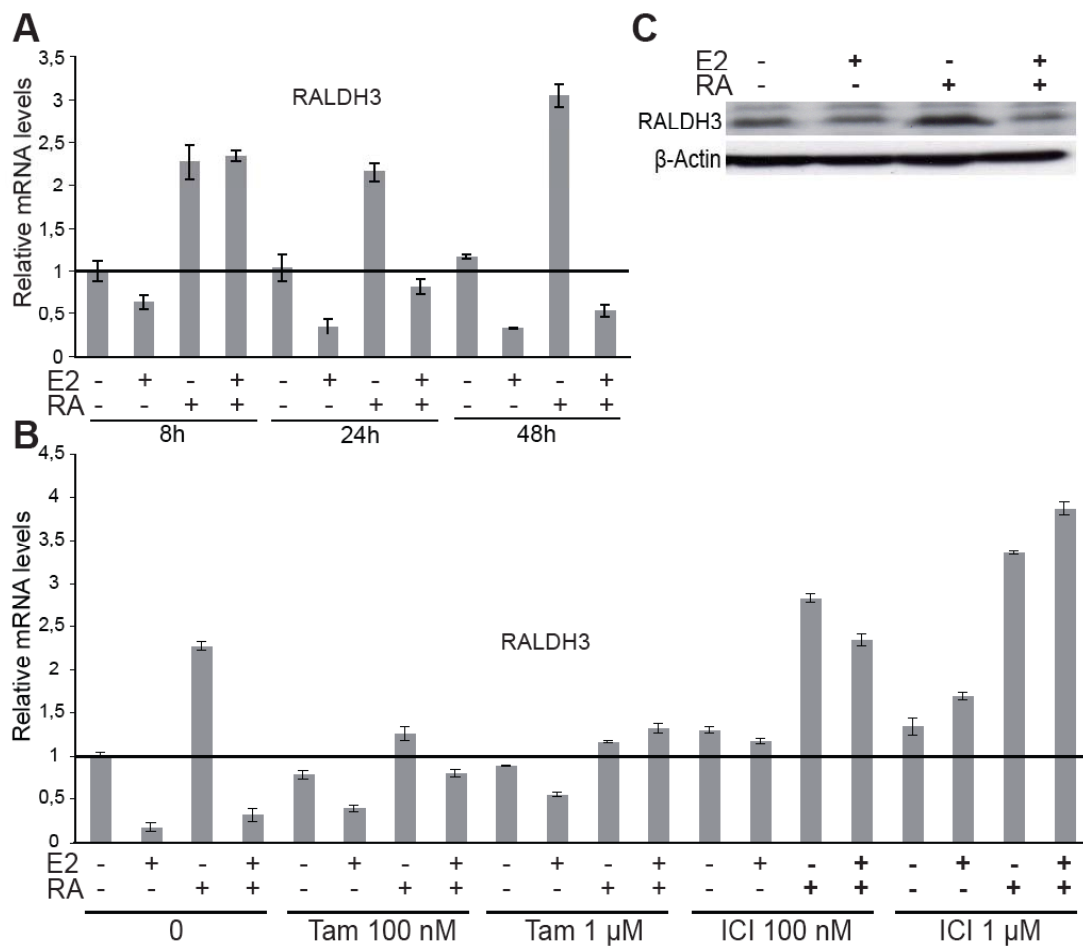
**Figure 6**

Low RALDH3 levels in ER $\alpha$ -positive tumors.



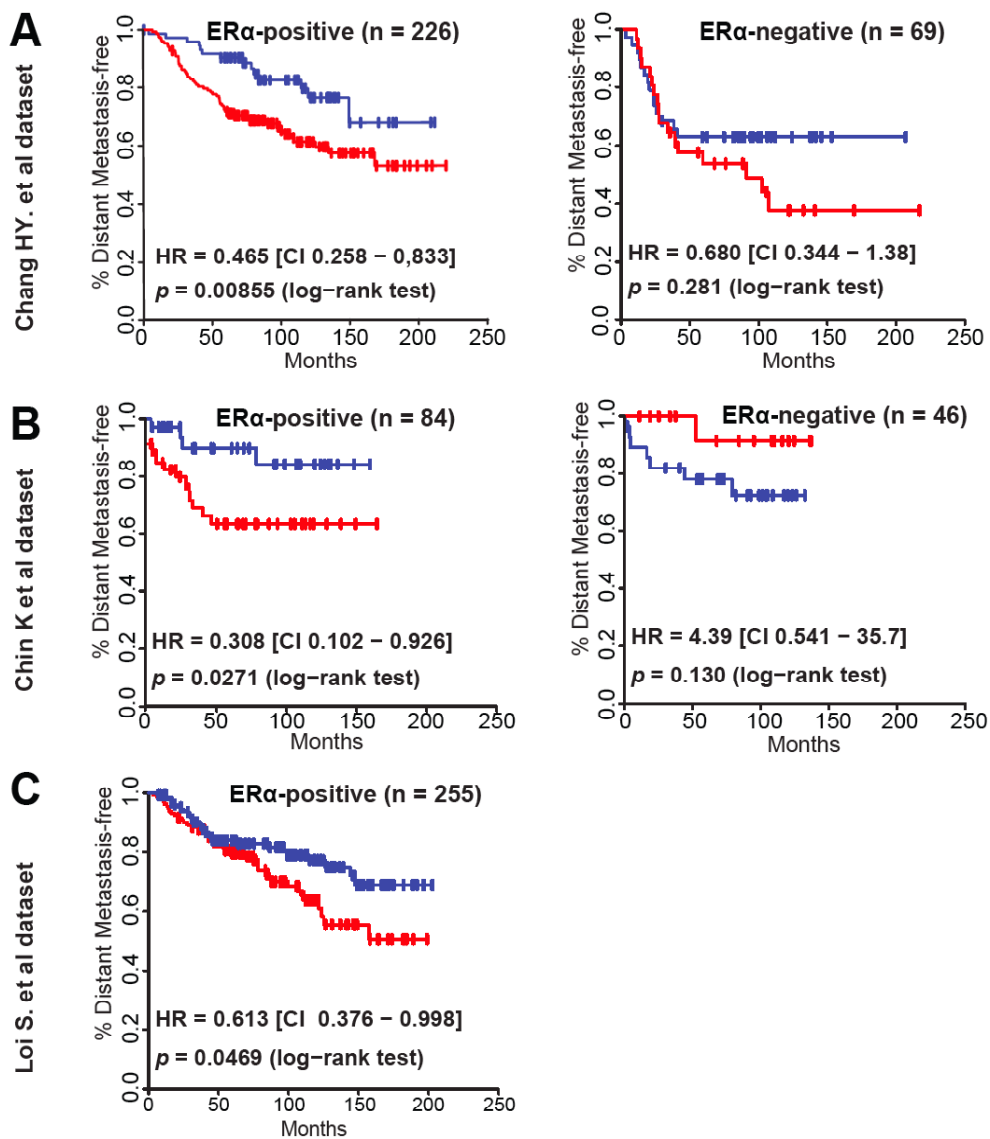
**Figure 7**

Active RALDH3 restores RA synthesis and prevents proliferation of SKBR3 cells more efficiently than active RALDH1.



**Figure 8**

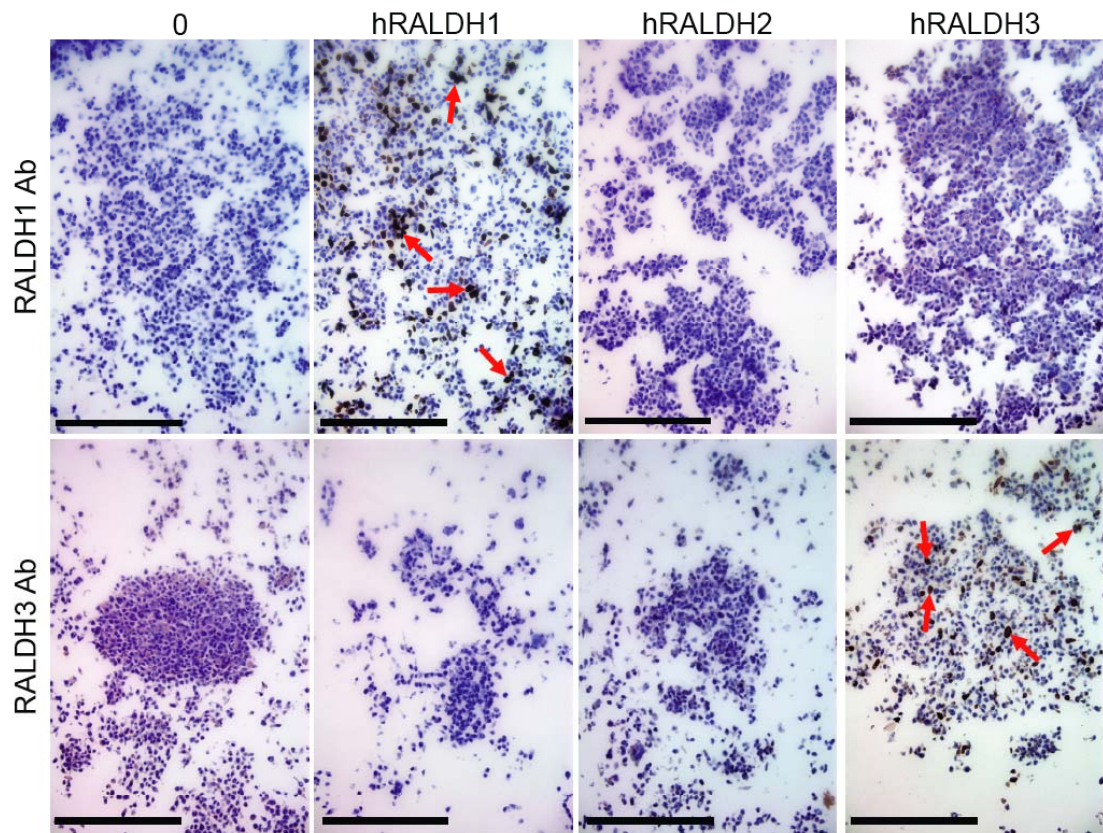
RALDH3 expression is induced by RA and repressed by estradiol in MCF-7 cells.



**Figure 9**

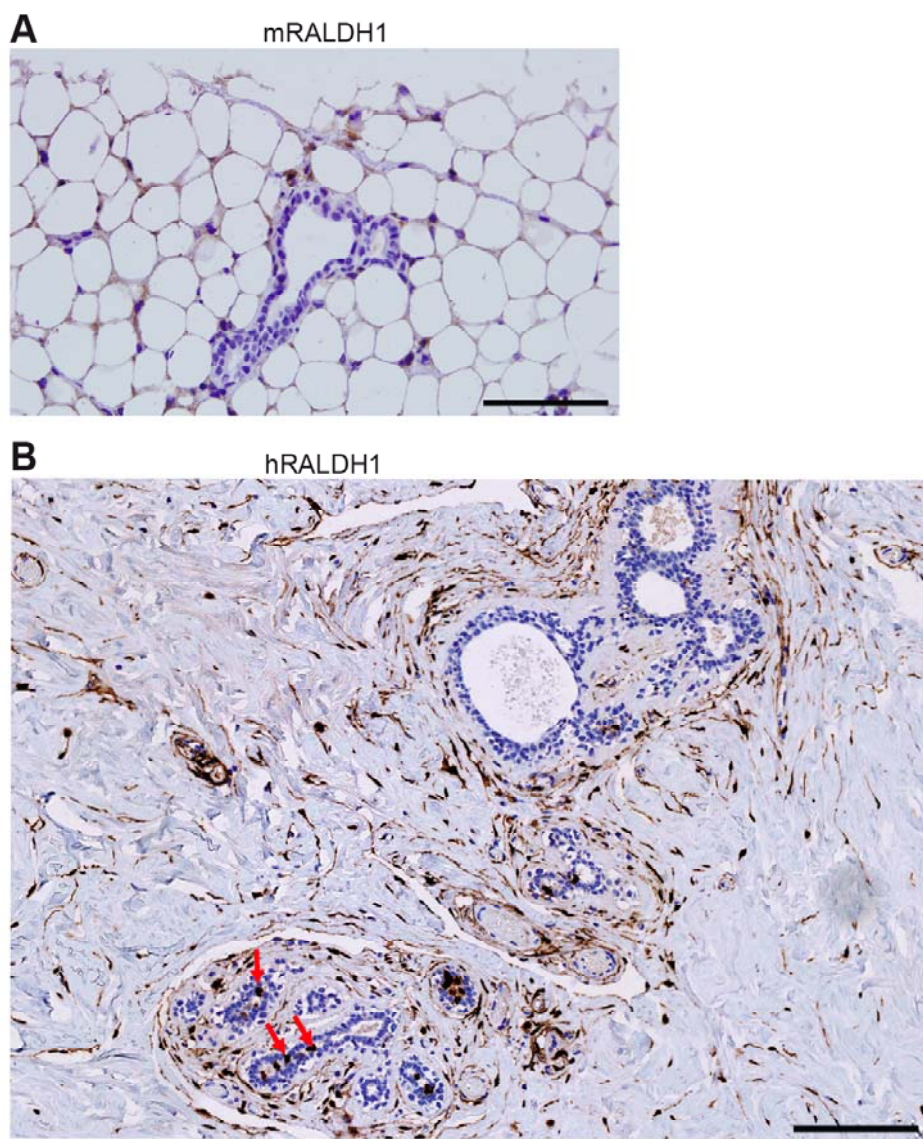
Expression level of RALDH3 in tumors predicts distant metastasis-free survival in breast cancer patients.





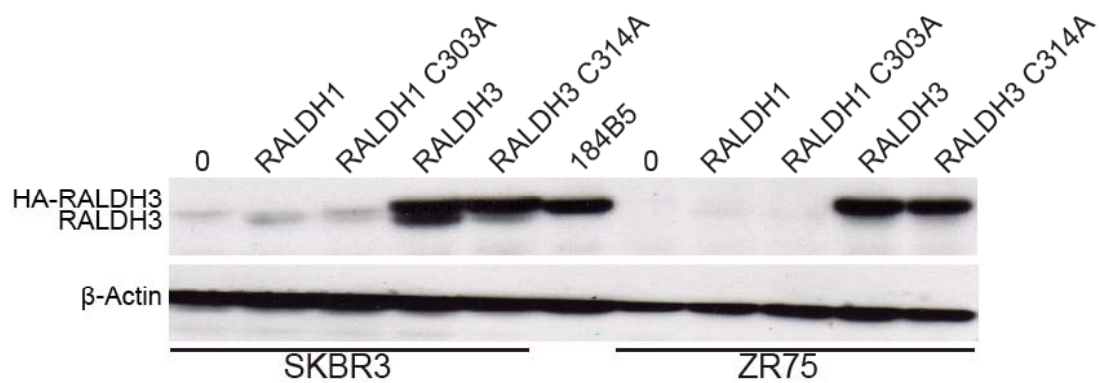
**Figure supplémentaire 1**

Specificity of antibodies against RALDH1 or RALDH3 under IHC conditions.



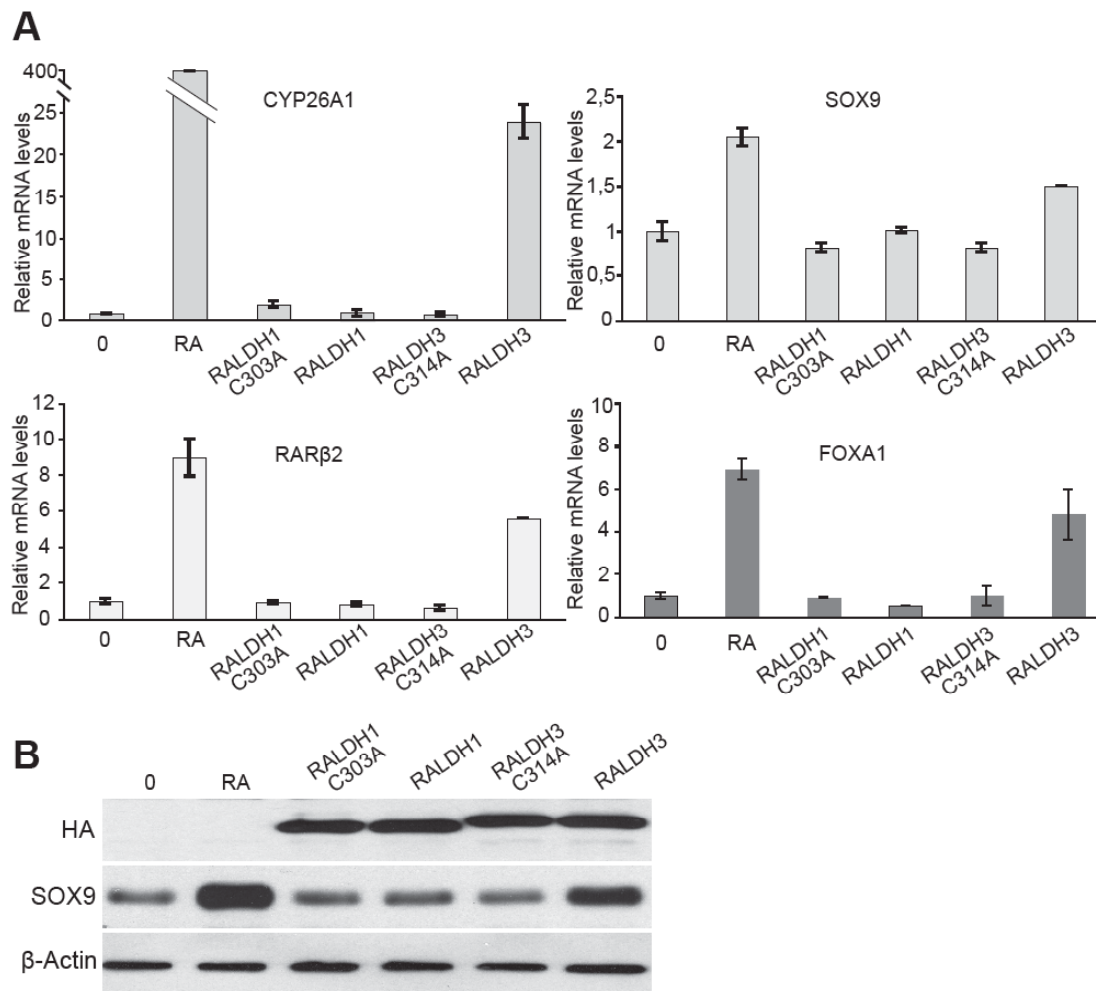
**Figure supplémentaire 2**

Expression pattern of RALDH1 in the mammary gland



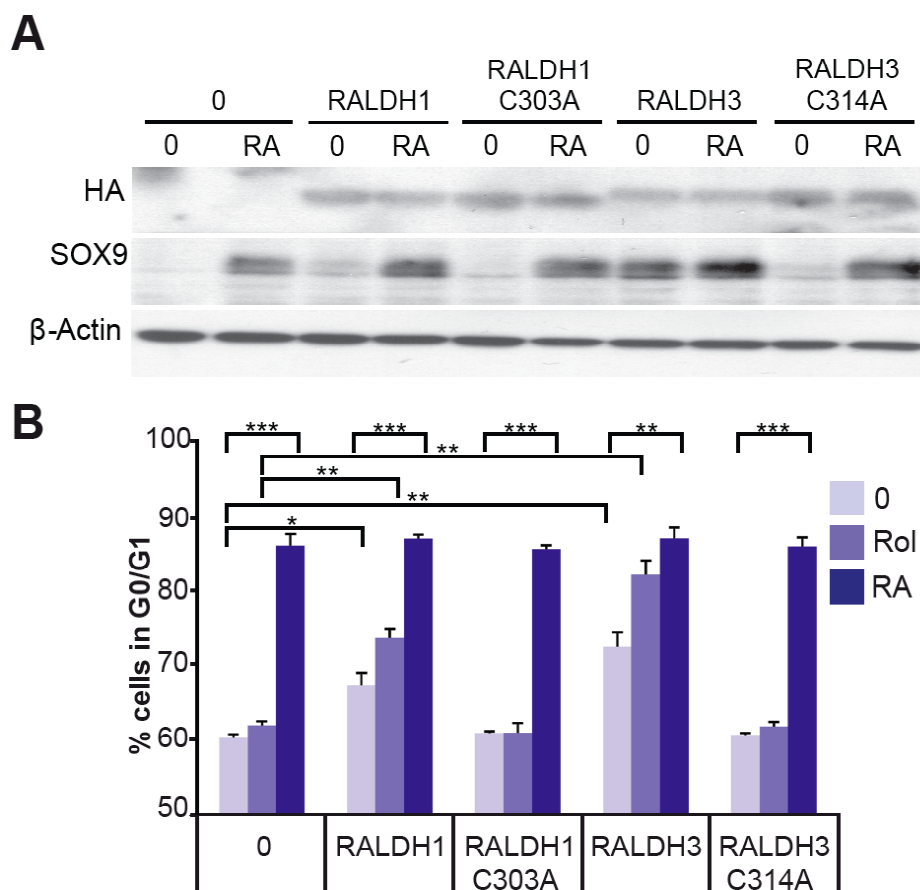
### Figure supplémentaire 3

RALDH3 expression levels in transfected SKBR3 and ZR-75 cells are comparable to endogenous levels in immortalized non-tumorigenic 184B5 cells.



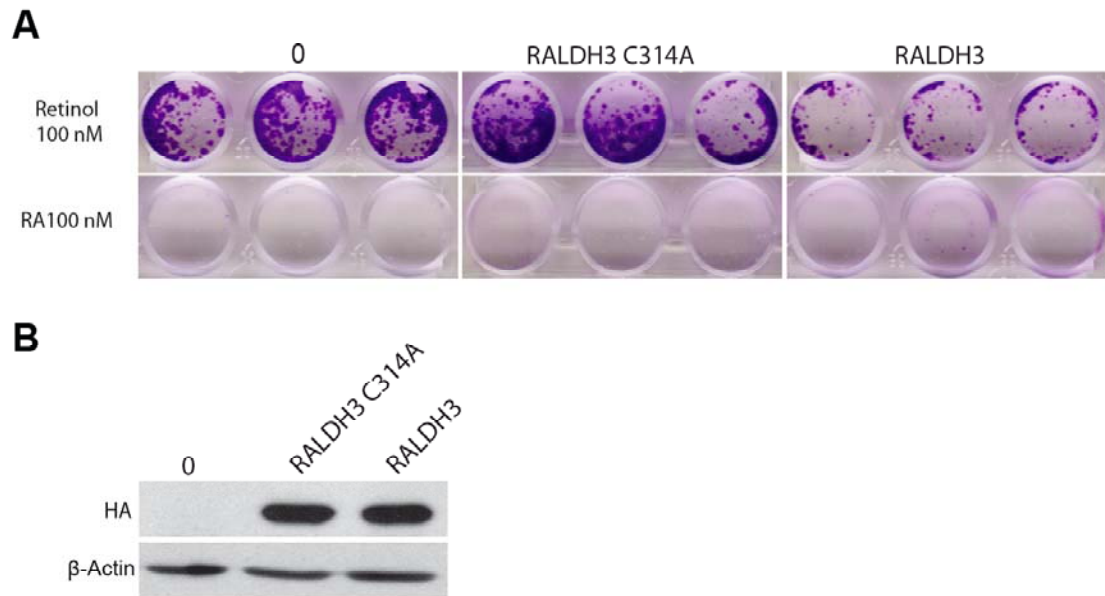
**Figure suppl ementaire 4**

RALDH3 expression induces the expression of known RA target genes.



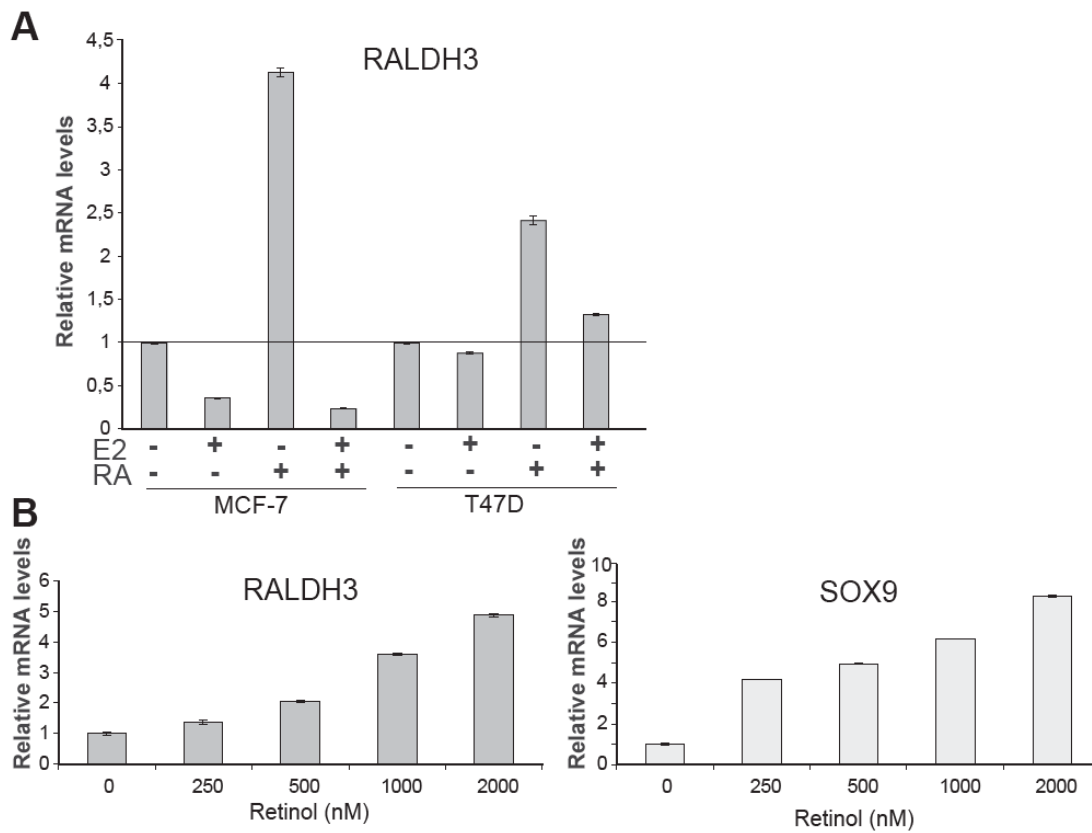
**Figure supplémentaire 5**

RALDH3 restores RA synthesis and increases the G0/G1 fraction in ZR-75 cells more efficiently than RALDH1.



**Figure supplémentaire 6**

Expression of RALDH3, but not of the catalytically inactive RALDH3 mutant C314A, suppresses colony formation in MCF-7.



**Figure supplémentaire 7**

RALDH3 expression is induced by retinoids and repressed by E2 in luminal cells.

**3<sup>e</sup> article: Lack of specificity of the Aldefluor assay for ALDHs results in co-purification of different mammary epithelial cell populations**

(En préparation)



## Lack of specificity of the Aldefluor assay for ALDHs results in co-purification of different mammary epithelial cell populations

Maxime Parisotto<sup>1, 4</sup>, Hiba Zahreddine<sup>1</sup>, Slim Fourati<sup>1, 4</sup>, Carolyn Nessim<sup>1</sup>, Martine Bail, Pangala V. Bhat<sup>2</sup>, André Robidoux<sup>3</sup>, Louis Gaboury<sup>1, 2, 5</sup> and Sylvie Mader<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> Institute of Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, <sup>2</sup>Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CR-CHUM)-Hotel-Dieu, <sup>3</sup>Department of Surgery, Université de Montréal, <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Université de Montréal, <sup>5</sup>Department of Pathology and Cell Biology, Université de Montréal

Keywords: Breast, RALDH, differentiation, Aldefluor

**Conflict of interest:** the authors have declared that there is no conflict of interest.

List of non-standard abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase;; IHC, immunohistochemistry; RA, retinoic acid; RALDH, retinal dehydrogenase; RAR, retinoic acid receptor;; RXR retinoid X receptor; EMT, epithelial to mesenchymal transition; IPTG, Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; DEAB,

Diethylaminobenzaldehyde; HSC, hematopoietic stem cells; BAAA BODIPY-aminoacetaldehyde.

## ABSTRACT

Cell populations enriched in breast cancer initiating cells can be purified based on high aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity using a fluorescent detection method, the Aldefluor assay. Here we show that two closely related ALDHs, ALDH1A1 and ALDH1A3, are expressed in normal and tumorigenic breast tissues with distinct expression profiles, suggesting that they identify different cell populations. Although strong co-expression of the two enzymes was observed only in one tumor cell line, and not in our sample of 100 tumors, co-expression with low levels of one of the two enzymes was more frequent. In SKBR3 cells, the two enzymes were expressed in a heterogeneous manner and the ALDH1A1 population was of smaller size than the ALDH1A3 one. Transient expression of either ALDH in Aldefluor®-low HeLa cells indicates that expression of either enzyme can yield Aldefluor bright populations. Furthermore, expression of an shRNA against ALDH1A3 in immortalized 185B5 cells, which do not detectably express ALDH1A1, shifts cells away from the Aldefluor®-bright fraction. DEAB, the specificity control used in the Aldefluor® assay, is selective for ALDH1A1 but also inhibits ALDH1A3 with an approximately 10-fold difference in IC50. However, in spite of their high degree of identity, ALDH1A1 and ALDH1A3 have markedly different substrate preferences that could be exploited to discriminate between cell populations expressing the two enzymes.

## INTRODUCTION

Breast carcinomas, one of the most frequent cancers in western countries, are thought to arise due to aberrations of mammary epithelial cell differentiation or oncogene-driven de-differentiation processes, sometimes including epithelial to mesenchymal transition [1, 2]. Understanding the mechanisms underlining the proper differentiation and maintenance of the mammary epithelium would thus help to develop improved breast cancer therapeutics.

The mammary gland is a highly dynamic organ essentially made of a bulk of mesenchymal tissue (stroma) colonized during development by epithelial cells derived from the ventral ectoderm of the embryo [3, 4]. The epithelial compartment delineates the walls of a network of branched tubules and lobules that secrete and canalize milk toward the nipple during lactation.

The mammary epithelium is pseudo-stratified and mainly composed of two layers of epithelial cells, an outer basal and an inner luminal layer. It was shown in 1998 by serial transplantations that a small fraction of the basal cells population had the ability to recapitulate a complete, anatomically normal and functional mammary gland when only one of these cells was injected into the cleared mammary fat pad of a recipient mouse [5]. This had been the first isolation of mammary stem cells, however based on a random procedure that would not allow for the purification of a substantial number of these very rare cells for genomic studies or functional purposes. Moreover it is now broadly accepted that the mammary epithelial compartment has a highly hierarchal organization including parental stem cells, but also the progeny of the basal or luminal lineages as well as cells in terminal

differentiation [6]. Some of these cells were recently isolated and partially characterized via genetic profiling [7].

The isolation of highly enriched populations of mammary stem or progenitors remains a crucial technical challenge. Strategies to separate and partially purify populations of mammary cells have been developed by adapting classic methods used for isolation of hematopoietic stem cells (HSC) and progenitors, based on the detection of cell surface markers like Sca-1, CD24 or CD44, using fluorescence-coupled antibodies [8, 9]. However cell sorting is often preceded by short term culture, which could alter the biological properties and gene expression profiles of cells to be purified, and the detection of markers with antibodies in living cells is limited to cell surface markers.

An alternative strategy to purify normal and cancer mammary stem cells is based on the detection of their high aldehyde dehydrogenase activity. Aldehyde dehydrogenases (ALDHs) are enzymes involved in several biological processes, including the elimination of various toxic aldehydes produced in cells as a result of diverse oxidative stresses [10-12]. About 20 proteins belonging to this family were identified and several of them were found to be involved in different metabolic pathways [13, 14], including in the synthesis of retinoic acid (RA) from retinal for the members of the retinal dehydrogenase subfamily, ALDH1A1/2/3 (also named respectively RALDH1/2/3) [15-17]. ALDH activity can be quantified in living cells using the Aldefluor® kit (Stemcell technologies, Vancouver), based on fluorescent detection of the oxidized product of the substrate BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyde). DEAB, an inhibitor of ALDHs [18], is believed to allow

specific monitoring of the aldefluor® activity that is detected in cells by this kit. This method has been used successfully to obtain enriched populations of stem cells from various tissues, including the hematopoietic compartment [19], but also in the muscles [20], brain [21], prostate [21], intestine [22], adipose tissue [22] and in the mammary gland. The aldefluor® activity detected in mammary cells was attributed to the expression of ALDH1A1 [23]. However, the aldefluor®-positive fraction from normal or tumoral human mammary samples was found to be enriched with cells that are able to recapitulate the formation of respectively a normal mammary gland or a tumor in all their original cellular heterogeneities [23].

RA is believed to be a potent differentiating agent in the hematopoietic compartment [24]. Even though its role in the differentiation of HSC remains controversial due to contradictory results [25], it was shown that treatment of HSC with DEAB inhibits RA signaling, blocks their differentiation and induces their self-renewal [26]. These data suggest that DEAB might act by inhibiting ALDH1A1, that was shown to be specifically and highly expressed in hematopoietic stem cells (HSC) [27-29]. But genetic suppression of ALDH1A1 in mouse had no observable effects on the hematopoietic system [30]. Indeed, hematopoietic cells populations from mice that lack ALDH1A1 have the same Aldefluor® activity profile as hematopoietic cells from wild type mice, strongly suggesting that other ALDHs contributing for the aldefluor® activity could be expressed in these cells and that the substrate BAAA may also be recognized by these enzymes.

In addition, in human, only a fraction of aldefluor®-positive normal mammary epithelial cells stained positively with an ALDH1A1 antibody (while all

aldefluor®-negative cells stained negatively) [23], raising the possibility that cells expressing other ALDHs could be co-purified with the ALDH1A1-positive cells. We and others have observed that normal luminal mammary cells are able to synthesize RA from retinal and express one of the members of the ALDH1A family, ALDH1A3 ([31] and article 2). We have also shown that ALDH1A3 is a marker of good prognosis in ER $\alpha$ -positive breast cancers, while ALDH1A1 was proposed to be a marker of poor prognosis in breast cancers [23]. This suggests that ALDH1A3 and ALDH1A1 might be markers of different populations of mammary cells (normal or tumoral). Moreover, the respective contributions of ALDH1A1 and 3 to the aldefluor® activity detected in mammary cells is yet unknown.

Here we have sought to characterize the expression patterns of ALDH1A1 and ALDH1A3 in mammary cell lines as well as in normal breast tissue and tumors. In addition, we aimed at determining whether the Aldefluor® assay could discriminate between the two isoforms ALDH1A1 and 3.

## RESULTS

### **ALDH1A3 and 1 are expressed in a non-overlapping pattern in mammary tumors**

To compare expression patterns of ALDH1A1 and 3 in breast tumors, we analyzed a tumor microarray comprising 100 invasive carcinomas classified as ER $\alpha$ -positive, HER2-positive and triple-negative types (triplicate cores were arrayed for each tumor) with antibodies directed against human ALDH1A1 or ALDH1A3. Specificity of the antibodies was verified using IHC of cell lines with characterized expression levels of ALDH1A1 and ALDH1A3 (see article 2). Scores were attributed to each core based on intensity of staining (Figure 1A). The proportion of tumors with a high expression of ALDH1A1 (score  $\geq 2$ ) was higher in the HER2-positive type (Figure 1B) compared to the other tumor types, in agreement with previous studies showing a link between the expression of HER2 and ALDH1A1 in breast tumors [32, 33]. The proportion of tumors exhibiting a high expression of ALDH1A3 (score  $\geq 2$ ) is lower in luminal tumors (Figure 1B) compared to the other types of tumors. Moreover, tumors with a high expression of ALDH1A1 or ALDH1A3 (score  $\geq 2$ ) are represented in every tumor types but represent a relatively modest proportion of the total number of tumors (Figure 1B), respectively 13 % for ALDH1A1 (13 tumors) and 21 % for ALDH1A3 (21 tumors). Interestingly, there is almost no overlap between these two groups of tumors, as only one tumor expresses both ALDH1A1 and ALDH1A3 with a score above 2 (Figure 1C; tumor with a score of 2,0 for ALDH1A1 and 2,33 for ALDH1A3).



These data indicate that breast tumors express extremely variable levels of ALDH1A1 and ALDH1A3, although simultaneous high expression was not observed. Most tumors (58 %) express low levels of either ALDH1A1 and/or ALDH1A3 (score < 2).

### **Expression of ALDH1A1 and 3 is heterogeneous in the cancer cell line SKBR3**

In a previous study we analyzed the expression of ALDH1A1 and 3 in a panel of mammary cells lines both by Q-PCR and western analysis (see article 2). Consistent with our observations with tumors, expression of ALDH1A1 and ALDH1A3 were very variable and generally low in ER $\alpha$ + breast cancer cell lines for both enzymes. Simultaneous expression was observed to relatively high levels for both enzymes only in one basal cell line (MDA-MB-468) and to lower levels in HER2-positive cell lines (SKBR3, BT-474 and MDA-MB-361). To determine whether expression of ALDH1A1 and 3 is homogeneous in the population of cells co-expressing these enzymes, formalin-fixed paraffin-embedded cell pellets of SKBR3 were stained with antibodies directed against ALDH1A1 and ALDH1A3. Expression of both ALDH1A1 and ALDH1A3 was highly heterogeneous in SKBR3 (Figure 2A), with some cells staining strongly and others not at all. ALDH1A1 expression was restricted to a smaller number of cells than that of ALDH1A3. This result is compatible with the hypothesis that ALDH1A1- and 3- expressing cells represent different populations in breast cell lines.

### **ALDH1A1 and 3 are expressed in distinct cell populations in normal mammary epithelium**

We previously reported that ALDH1A3 is expressed predominantly in the luminal compartment of mammary ducts (see article 2) while ALDH1A1 was only found in rare cells of the mammary epithelium and mainly in the terminal ductal lobular units [23]. We performed staining of normal human mammary tissue with antibodies directed against ALDH1A1 and 3. We confirmed that ALDH1A3 is expressed mainly in ducts but not in lobules in contrast with ALDH1A1 that appears to be expressed essentially in lobules and rarely in tubules (Figure 3). These data suggest that the generally mutually-exclusive expression of ALDH1A1 and 3 in tumor cells could result from a different origin or stage of dedifferentiation of the majority of cells in the tumors.

### **The Aldefluor assay does not discriminate between ALDH1A1 and ALDH1A3 expression.**

Use of the aldefluor® assay has been demonstrated to lead to purification of breast cancer cell populations with increased capacity to form mammospheres in anchorage-independent tissue culture conditions, and to form tumors in xenograft experiments. The Aldefluor assay is thought to correlate with ALDH1 expression in breast cancer cell lines [23], however it is unknown if ALDH1A3-expressing cells are detected as Aldefluor-positive (or bright) cells. Since we observed expression of both enzymes in breast tumors and breast cancer cell lines to variable levels, and as expression of

ALDH1A1 and ALDH1A3 appears to reflect different cell types, we tested whether the Aldefluor assay is specific for ALDH1A1 vs ALDH1A3.

We transiently co-transfected the aldefluor®-negative HeLa cell line, with expression vectors for either human ALDH1A1 or ALDH1A3 fused to HA tags and with a vector expressing the red fluorescent protein DsRed2. An aldefluor® analysis of transfected cells was performed 48 h after transfection. A fraction of the transfected cells was also analyzed by western-blot with an HA-tag antibody to ensure that ALDH1A1 or 3 were expressed (Figure 4A). Only transfected cells (DsRed-positive) were considered to ensure that only ALDH1A-expressing cells were analyzed. Expression of either ALDH1A1 or 3 increased the mean of aldefluor® intensity (Figure 4B) and the number of cells in the aldefluor-bright population (Figure 4C) when the gate was set with the parental empty vector in the presence of the inhibitor DEAB (0). The activity observed with either enzyme was inhibited by DEAB suggesting that under the conditions of the assay neither DEAB nor the substrate of the kit (BAAA) discriminate strongly between the two enzymes.

Detection of ALDH1A3 by the aldefluor® assay was then investigated using immortalized 184B5 cells, which express ALDH1A3 but not detectably ALDH1A1 (REF). A population of aldefluor-bright cells was detected in this cell line. To assess whether ALDH1A3 expression is responsible for this detection, we infected 184B5 cells with a lentiviral expression vector for an shRNA directed against ALDH1A3; a non-target shRNA was used as a control. While knock-down of ALDH1A3 expression was only partial (Figure 5A), it shifted a population of cells from Aldefluor-bright to low (Figure 5B and 5C). All together these results demonstrate

that the aldefluor® assay used under conditions recommended by the manufacturer detects both ALDH1A1 and ALDH1A3 activities, suggesting that ALDH1A1- and ALDH1A3- expressing cells could be copurified by this method.

### **DEAB is selective but not specific for ALDH1A1.**

To test more directly whether DEAB, provided in the aldefluor® kit as a specificity control for ALDH activity, is specific for ALDH1A1, we expressed human ALDH1A1 and 3 as his-tag fusions in bacteria and purified them on a NI-NTA column. Both pure recombinant proteins were active with all-*trans* retinal as a substrate (Fig. 6A), and we assayed the capacity of DEAB to inhibit this activity (Figure 6B). DEAB inhibited ALDH1A1 more efficiently than ALDH1A3 (IC<sub>50</sub> of 2,37 µM vs 20 µM). However this selectivity for ALDH1A1 is likely insufficient to cleanly differentiate between cells expressing either enzyme in the aldefluor assay.

We also tested whether a similar lack of specificity is observed using murine ALDH1A1 and ALDH1A3. A similar about 10-fold difference in IC<sub>50</sub>s was also observed using octanal as substrate (IC<sub>50</sub> 55 nM and 0,67 µM with ALDH1A1 and ALDH1A3, respectively, see supplemental figure).

### **ALDH1A1 and ALDH1A3 have different substrate specificities for retinal isomers.**

Both ALDH1A1 and ALDH1A3 are ALDHs that are active with retinal substrates *in vitro* and thus may contribute to the synthesis of RA in breast tumor cells, potentially leading to differentiating and or anti-proliferating effects. We have previously

observed that mouse and rat ALDH1A1 have activity with both all-*trans* and 9-*cis* retinal, while mouse ALDH1A3 has activity with only all-*trans* retinal. This observation is of interest for the development of synthetic substrates that discriminate between the two enzymes. However, substrate selectivity can vary between species, as monkey ALDH1A1 was not active with 13-*cis* retinal, while both rat and mouse isomers were active with this isomer.

To test the differential substrate preference for retinal substrates observed with murine enzymes is conserved in the human enzymes, we performed *in vitro* enzymatic assays with all-*trans* and 9-*cis* retinal as substrates. Note that our preparation of ALDH1A3 is poorly active due to partial precipitation during the assay, precluding comparison of the kinetic constants between the two enzymes. Nevertheless, our results confirm that human ALDH1A3 has strong activity with for all-*trans* but not 9-*cis* retinal, while human ALDH1A1 was active with both isomers of retinal (Figure 6A), in agreement with results previously obtained with mouse ALDH1A3 and rat ALDH1A1 [15]. In a previous study, we found that  $\beta$ -ionone, structurally analogous to the cyclic part of retinal, was a competitive inhibitor of mouse ALDH8A1, but not of mouse ALDH1A3 [15] suggesting that the  $\beta$ -ionone ring of retinal is not a major site of recognition for mouse ALDH1A3. We show here that  $\beta$ -ionone is an inhibitor of human ALDH1A1 (IC<sub>50</sub> of 0,73 mM, Fig. 6C) but is a poor inhibitor of human ALDH1A3 suggesting that these two enzymes have distinct modes of substrate recognition in spite of their highly conserved sequences. These properties may be exploited for the design of substrates or inhibitors that differentiate between the two enzymes.

## DISCUSSION

The respective roles of ALDH1A1 and 3 in the development and tumorigenesis of the mammary gland are not known. We have previously shown that ALDH1A3 is a marker of lower metastatic risk specifically in ER $\alpha$ -positive tumors (see article 2). However, ALDH1A1 expression correlates with more aggressive tumors [32] and is a marker of bad outcome in breast cancer [23]. Here we show that mammary tumors do not express both ALDH1A1 and ALDH1A3 together at high levels, suggesting that ALDH1A1- and ALDH1A3-expressing tumors represent phenotypically different types of cancers. Moreover in breast cancer cells, expression of ALDH1A1 or ALDH1A3 is highly heterogeneous, in agreement with the proposed heterogeneous nature of mammary epithelial cells [34].

A hierarchical organization has been proposed to explain this heterogeneity [7, 35-37]. Hence, ALDH1A1/3-expressing cells may represent different populations in the mammary hierarchy. ALDH1A1 has been proposed as a marker of normal human mammary stem cells [23]. The analysis of the expression profile of different progenitors and differentiated cells of the mammary gland [7] suggests that ALDH1A3 is a marker of luminal-restricted progenitor cells. However, ALDH1A1 was not expressed differentially between the different progenitor populations in this microarray analysis. Our data suggest that in normal human mammary tissue, ALDH1A1 and 3 have different expression patterns, ALDH1A1 being expressed preferentially in lobules and ALDH1A3 in ducts. However, ALDH1A3 expression

has also been observed in some lobules, indicating that partial overlap between the expression patterns of these enzymes remains possible.

A large amount of published data indicates that the aldefluor® assay identifies a population of cells enriched in cancer initiating cells. While a correlation between the presence of Aldefluor-bright cells and ALDH1A1 has been suggested [23], we show here that this assay is not able to discriminate between ALDH1A1- and ALDH1A3-expressing cells. Although the inhibitor DEAB is selective for ALDH1A1, the 10-fold difference in IC50s observed *in vitro* does not translate into an easily exploitable discriminating power *in vivo*. Thus, if ALDH1A1 is the targeted marker, potential contamination by ALDH1A3-positive cells may occur. As we have shown that expression of these enzymes defines different populations in breast cancer cells, this cross-reactivity of the aldefluor® assay with different ALDHs is likely a confounding factor for the isolation of cancer initiating cells. Thus, development of reagents that differentiate between the two types of enzymes would be highly desirable.

In spite of their closely related sequences, the ALDH1A1 and 3 have distinct substrate specificity and kinetics properties, possibly due to differences in their active sites [15, 38, 39]. This raises the possibility of rational design for fluorescent substrates or inhibitors highly selective for ALDH1A1 or ALDH1A3. The differential activity of *9-cis* versus *all-trans* retinal for ALDH1A1 and ALDH1A3 suggests a major importance of the carbon chain preceding the aldehyde function for discrimination between the two enzymes, a conclusion reinforced by the observation that the  $\beta$ -ionone ring does not significantly inhibit ALDH1A3 activity. These

reagents may be used to optimize the aldefluor® method in order to achieve a higher degree of purification of the different sub-populations of normal and tumorigenic mammary epithelial cells. These tools are expected to provide crucial help to better understand the regulation of cell fate determination in the mammary epithelial tissue.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Recombinant plasmids**

Cell expression: human ALDH1A1 and 3 cDNAs were inserted in the pCDNA3.1-neo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fused with an adaptor encoding an N-terminal hemagglutinin (HA) tag sequence. pCDNA3.1-DsRed2 was a generous gift of Dr. D. Lamarre (IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada).

Bacterial expression: human ALDH1A1 and 3 cDNAs were inserted in the pET28a vector (Novagen, Darmstadt, Germany) and fused with an N-terminal hexa-histidine tag (his-tag) sequence.

### **Cell culture**

All cell lines were purchased from American Type Culture Collection ATCC (Manassas, VA, USA). Immortalized 184B5 cell lines were maintained in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium/Ham's F-12 medium (50:50 mix, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 1% penicillin/streptomycin (Wisent), 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Wisent), cholera toxin (Sigma-Aldrich; 1 ng/ml and 10 ng/ml EGF (Wisent). SKBR3 and Hela cell lines were maintained in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS for SKBR3, 5% for Hela and 1% penicillin/streptomycin.

### **Preparation of protein extracts**

For Western analysis, cells were maintained in their respective media and were harvested as following: cells were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline (PBS) and were collected in ice-cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1% NP-40, 5% glycerol) supplemented with 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors (all from Sigma-Aldrich). Cells were incubated 10 min at 4°C and sonicated 5 minutes (maximal intensity, three on/off cycles) on a Bioruptor (Diagenode, Sparta, USA) followed by centrifugation at 16,200 g for 15 min. Protein concentrations in supernatants were quantified following the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### **Western blot analysis**

Protein extracts were separated by electrophoresis on an SDS-polyacrylamide gel (10%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corporate, Billerica, MA, USA). Membranes were blotted with antibodies directed against the HA tag (12CA5, Santa Cruz Biotechnology), ALDH1A3 (C13, Santa Cruz Biotechnology) or  $\beta$ -Actin (A-5441, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies (anti mouse-HRP, anti-goat-HRP and anti rabbit-HRP) were purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada).

### **Tissue staining and immuno-histochemistry**

All cell samples, tissue samples and tissue microarrays (see below) were formalin fixed and paraffin embedded at the IRIC histology core facility (IRIC, Montreal, QC, Canada). For staining, deparaffinization and antigen retrieval were performed using a Discovery XT automatic stainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) using protocols recommended by the manufacturer. Primary antibodies used were directed against ALDH1A1 (ALDH, BD Biosciences, 1:50 dilution for 60 min at room temperature), ALDH1A3 (C-13, Santa Cruz Technologies, 1:50 dilution for 3 hr at room temperature). Primary antibody incubation was followed by incubation with appropriate biotin conjugated secondary antibodies (1:100 dilution, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA). For staining, streptavidin-horseradish peroxidase, and 3,3 diaminobenzidine were used according to the manufacturer's instructions (DABmap detection Kit, Ventana Medical Systems). The sections were then counterstained with Gill hematoxylin and a bluing reagent was applied for postcounterstaining. Sections were scanned at X40 magnification using the C9600 NanoZoomer System (Hamamatsu Corporation, Bridgewater, NJ, USA), which can adjust focus on any part of the slide. NDP Scan software (version 2.2.17) was used to visualize virtual slides and extract images. For double staining, the first staining was performed using the ALDH1A3 antibody as for single staining but was followed by a denaturation step (90°C, 4 minutes) before ALDH1A1 staining with the REDmap detection Kit (Ventana Medical Systems) according to the manufacturer's instructions.

### **Tissue microarrays**

Tissue samples were obtained from specimens of 143 patients with invasive breast carcinoma. All tissues were fixed in formalin and embedded in paraffin. The patient's age and pathologic parameters including tumor size, lymph node status, histological subtype, histological grade, nuclear grade, mitotic grade and SBR-EE grade were also recorded. The ER/PR and HER2 status of each specimen were used for classification of tumors as ER $\alpha$ -positive (ER $\alpha$ +), HER2-positive (HER2+) or triple-negative (Triple neg.). Tissue cylinders with a diameter of 1 mm were punched from each donor tissue block and three cylinders were arrayed for each sample in order to minimize tissue loss and to overcome tumor heterogeneity. All immunohistochemically-stained samples (see above) were scored independently by two pathologists. Sections were scanned at x40 magnification using the C9600 NanoZoomer System (Hamamatsu Photonics), which can adjust focus on any part of the slide. NDP Scan software (version 2.2.17) was used to visualize virtual slides and extract images. ALDH1A1 and ALDH1A3 staining were interpreted using a grading scale of 0-4 according to intensity of staining using a scale established by initial classification of degrees of expression in different tumors. This scoring was performed on each of the triplicate samples. Averages were then calculated for each tumor and for each class of tumors.

### **Aldefluor® analysis of ALDH1A1- and 3-expressing cells**

Hela cells were transfected by the PEI method (polysciences Inc. Warrington, USA) with either the parental pCDNA3.1-neo vector or vectors expressing HA-tagged

ALDH1A1 or ALDH1A3 together with a ten-fold lower amount of an expression vector for DsRed2 (pCDNA3.1-DsRed2). After 48 hr cells were trypsinized and a fraction of transfected cells were collected in lysis buffer for western analysis using a monoclonal antibody against the HA tag. The remaining transfected cells were stained with the Aldefluor® kit (Stemcells biotechnologies, Vancouver, Canada) using protocols recommended by the manufacturer and analyzed on a Canto flow cytometer (BD Biosciences). At least 30,000 DsRed-positive cells were used for each condition. Aldefluor® profile analysis was performed with ModFit LT 3.2 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

#### **Short Hairpin RNA (shRNA) infections**

184B5 cells were infected with lentiviruses expressing two different shRNA targeting ALDH1A3 and a non-target shRNA as a control of specificity (Mission shRNA, Sigma-Aldrich). Infected cells were selected with puromycin (Sigma-Aldrich) and knock-down of ALDH1A3 expression was then monitored by western-blot using an antibody directed against human ALDH1A3 (C13, Santa Cruz Biotechnology).

#### **Aldefluor® analysis of 184B5 cells**

Parental (not infected) and shRNA-expressing 184B5 cells were trypsinized and fractions were collected in lysis buffer for western analysis using an antibody directed against human ALDH1A3 (C13, Santa Cruz Biotechnology). The remaining cells were stained with the Aldefluor® kit (Stemcells biotechnologies, Vancouver, Canada) using protocols recommended by the manufacturer and analyzed on a Canto

flow cytometer (BD Biosciences). At least 30,000 cells were analyzed for each condition. Aldefluor® profile analysis was performed with ModFit LT 3.2 software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

### **Production and purification of human ALDH1A1 and ALDH1A3**

His-tagged human ALDH1A1 and 3 expressions were induced in E. Coli (BL21 pLysS) at 18°C for 18 h, with 0,5 mM IPTG (Sigma-Aldrich). Bacteria were then centrifuged (4000g, 20 minutes) and pellets were resuspended in lysis buffer ( Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, imidazole 20 mM, glycerol 10%) containing 50 µg/ml lysozyme (Sigma-Aldrich) and supplemented with 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and protease inhibitors (all from Sigma-Aldrich). Bacteria were incubated 30 min at 4°C and sonicated 15 minutes (maximal intensity, 15 on/off cycles) on a Bioruptor (Diagenode, Sparta, USA) followed by centrifugation at 45,000 g for 30 min. Supernatants were applied on a Ni-NTA-agarose column (Qiagen, Mississauga, Ontario). The columns were then washed with lysis buffer containing 80 mM imidazole (Sigma-Aldrich). ALDH1A1 and 3 were eluted with the elution buffer containing 400 mM imidazole. Protein concentrations in elution fractions were quantified following the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and purity was monitored by electrophoresis on an SDS-polyacrylamide gel (10%) followed by a coomassie blue staining (Sigma-Aldrich).

**In vitro enzymatic assays**

Enzymatic reactions were performed in 384-well black plates (VWR, Mississauga, Ontario) in a final volume of 50  $\mu$ l per well. Reactions were made in Tris-HCl 100 mM pH 8.5, tween20 0,02%, NAD<sup>+</sup> 602  $\mu$ M with various amounts of ALDH1A1 and 3 and various concentrations of retinal (Sigma-Aldrich) as a substrate (added as a 100x stock in DMSO). The reactions were followed by monitoring the production of NADH with an Envision plate reader (Perkin-Elmer, Woodbridge, ON). Fluorescence of NADH was read at nm (excitation at nm). Inhibition assays were performed in the same conditions but with constant amounts of ALDH1A1 or ALDH1A3 (100ng per reaction) and of retinal (10  $\mu$ M) but various concentrations of DEAB or  $\beta$ -ionone (Sigma-Aldrich) added as a 100x stock in DMSO. NADH concentrations were determined by comparison with a standard curve of NADH (Roche applied biosciences, Laval, Quebec, Canada). Kinetic parameter were determined with Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA)

## **Acknowledgments**

The authors gratefully acknowledge the highly valued technical support of J. Hinsinger, M. Fortin and M. Narlis from the histology platform, D. Gagné from the flow cytometry platform and J. Duchaine from the high throughput screening platform at IRIC. IRIC is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research (CECR), the Canada Foundation for Innovation (CFI), and the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). MP was supported by studentships from the Faculté des Études Supérieures at Université de Montréal. SM is recipient of a Chercheur Boursier National salary award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-81319) to PVB and SM.



## References

1. Hennessy, B.T., et al., *Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics*. *Cancer Res*, 2009. **69**(10): p. 4116-24.
2. Blick, T., et al., *Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines*. *Clin Exp Metastasis*, 2008. **25**(6): p. 629-42.
3. Veltmaat, J.M., et al., *Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation*. *Differentiation*, 2003. **71**(1): p. 1-17.
4. Mikkola, M.L. and S.E. Millar, *The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2006. **11**(3-4): p. 187-203.
5. Kordon, E.C. and G.H. Smith, *An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell*. *Development*, 1998. **125**(10): p. 1921-30.
6. Visvader, J.E., *Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis*. *Genes Dev*, 2009. **23**(22): p. 2563-77.
7. Raouf, A., et al., *Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(1): p. 109-18.
8. Stingl, J., et al., *Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells*. *Nature*, 2006. **439**(7079): p. 993-7.
9. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. *Nature*, 2006. **439**(7072): p. 84-8.

10. Pappa, A., et al., *Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27998-8006.
11. Ohsawa, I., et al., *Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells*. J Neurochem, 2003. **84**(5): p. 1110-7.
12. Murphy, T.C., et al., *Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A)*. J Neurochem, 2003. **86**(2): p. 298-305.
13. Vasiliou, V., A. Pappa, and D.R. Petersen, *Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism*. Chem Biol Interact, 2000. **129**(1-2): p. 1-19.
14. Vasiliou, V., et al., *Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping*. Pharmacogenetics, 1999. **9**(4): p. 421-34.
15. Sima, A., et al., *Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(12): p. 1660-4.
16. Gagnon, I., G. Duester, and P.V. Bhat, *Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1*. Biochem Pharmacol, 2003. **65**(10): p. 1685-90.

17. Gagnon, I., G. Duester, and P.V. Bhat, *Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1596**(1): p. 156-62.
18. Russo, J., et al., *Identification of 4-(N,N-dipropylamino)benzaldehyde as a potent, reversible inhibitor of mouse and human class I aldehyde dehydrogenase*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(3): p. 399-406.
19. Storms, R.W., et al., *Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 9118-23.
20. Jean, E., et al., *Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells*. J Cell Mol Med, 2009.
21. Corti, S., et al., *Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity*. Stem Cells, 2006. **24**(4): p. 975-85.
22. Huang, E.H., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3382-9.
23. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(5): p. 555-67.
24. Evans, T., *Regulation of hematopoiesis by retinoid signaling*. Exp Hematol, 2005. **33**(9): p. 1055-61.

25. L, E.P., *Roles of retinoids and retinoic Acid receptors in the regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation*. PPAR Res, 2007. **2007**: p. 87934.
26. Chute, J.P., et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11707-12.
27. Kastan, M.B., et al., *Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1990. **75**(10): p. 1947-50.
28. Magni, M., et al., *Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer*. Blood, 1996. **87**(3): p. 1097-103.
29. Christ, O., et al., *Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity*. Haematologica, 2007. **92**(9): p. 1165-72.
30. Levi, B.P., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1670-80.
31. Rexer, B.N., W.L. Zheng, and D.E. Ong, *Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells*. Cancer Res, 2001. **61**(19): p. 7065-70.
32. Morimoto, K., et al., *Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression*. Cancer Sci, 2009. **100**(6): p. 1062-8.

33. Korkaya, H., et al., *HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion*. *Oncogene*, 2008. **27**(47): p. 6120-30.
34. Hwang-Verslues, W.W., et al., *Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers*. *PLoS One*, 2009. **4**(12): p. e8377.
35. Stingl, J., et al., *Epithelial progenitors in the normal human mammary gland*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005. **10**(1): p. 49-59.
36. Stingl, J., et al., *Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue*. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. **67**(2): p. 93-109.
37. Stingl, J., et al., *Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast*. *Differentiation*, 1998. **63**(4): p. 201-13.
38. Montplaisir, V., et al., *Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans- or 9-cis-retinal*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(20): p. 17486-92.
39. Parisotto, M., et al., *[Retinoid metabolism and cancer]*. *Med Sci (Paris)*, 2006. **22**(12): p. 1101-6.

**FIGURE LEGENDS:**

**Figure 1.** ALDH1A3 and 1 are expressed in a non-overlapping pattern in mammary tumors. Paraffin-embedded formalin-fixed sections of breast tissue arrays containing triplicate samples from 100 patients were stained either with an anti-ALDH1A1 or an anti-ALDH1A1 mAb. Results were scored from 0 to 4 according to intensity of staining using a scale established by initial classification of expression in all tumors. (A) detail of tumors with scores of 0, 2 or 4 for ALDH1A1 or 1A3 (red arrows for examples of brown staining, magnification x40)). (B) distribution of tumors with a strong expression of ALDH1A1 or ALDH1A3 (score  $\geq 2$ ). (C) Venn diagrams of ALDH1A1-high and ALDH1A3-high tumors groups of tumors having a (score  $\geq 2$ ). Only one tumor in the sample set had medium expression of both enzymes.

**Figure 2.** Heterogeneous expression of ALDH1A1 and 3 in the cancer cell line SKBR3. Sections of paraffin-embedded formalin-fixed pellets of SKBR3 stained either with an anti-ALDH1A1 or an anti-ALDH1A3 mAb (magnification x20). See green arrows for non-stained cells, red arrows for strongly stained cells.

**Figure 3.** ALDH1A1 and 1A3 are expressed in distinct cell populations in normal mammary epithelium. Sections of paraffin-embedded formalin-fixed normal human mammary tissue samples stained either with an anti-ALDH1A1 or an anti-ALDH1A3 mAb (magnification x20). See red arrows for examples of strongly stained cells.

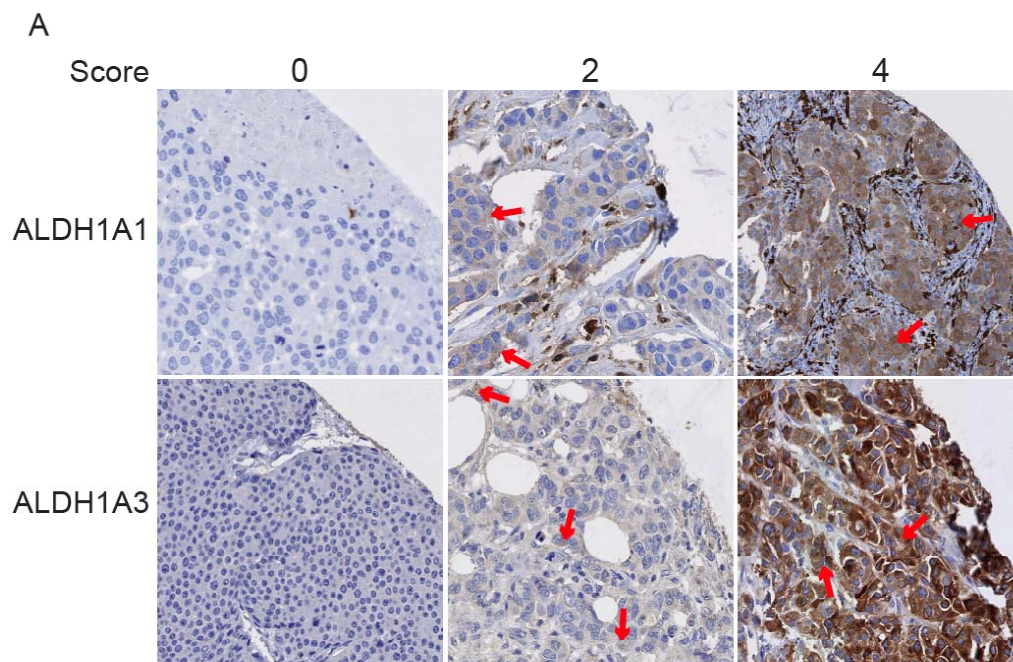
**Figure 4.** Expression of either ALDH1A1 or ALDH1A3 in Hela cells yields aldefluor®-bright cell populations. (A) Western analysis of HA-tagged ALDHs or  $\beta$ -

actin levels in transiently transfected HeLa cells. (B) Mean fluorescence intensity of the aldefluor® positive population of HeLa cells transiently expressing ALDH1A1 or ALDH1A3 as determined by FACS analysis. (C) Dot-plot representation of the FACS analysis of transfected HeLa cells showing the aldefluor®-high population (Aldefluor +).

**Figure 5.** shRNA-mediated down-regulation of ALDH1A3 expression decreases the proportion of aldefluor®-bright 184B5 cells. (A) Western analysis of ALDH1A3 or  $\beta$ -actin levels in parental or shRNA-expressing 184B5 cells. (B) percentage of aldefluor®-high cells in shRNA expressing 184B5 (shRNA are indicated on graph). (C) Dot-plot representation of the FACS analysis of parental or shRNA-expressing 184B5 cells showing cell distribution into aldefluor®-low and -high populations.

**Figure 6.** Pure recombinant ALDH1A1 and 1A3 have distinct sensitivities to DEAB and  $\beta$ -ionone *in vitro*. (A) Saturation curves of pure recombinant ALDH1A1 and 1A3 performed *in vitro* with pure recombinant human ALDH1A1 and 1A3 with 9-*cis* and all-*trans* retinal as substrate. Inhibition curves of human ALDH1A1 and 3 with DEAB (B) and  $\beta$ -ionone (C) performed *in vitro* with retinal as substrate.

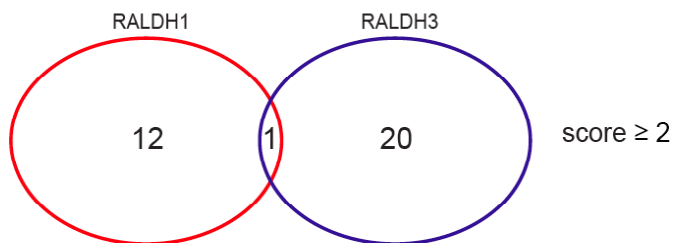
**Supplemental figure.** Mouse ALDH1A1 and rat ALDH1A3 are inhibited by DEAB. Inhibition curves of rat ALDH1A1 and mouse ALDH1A3 with DEAB performed *in vitro* with octanal as substrate.



B

Tumor type	Number of patients	% patients with scores $\geq 2$	
		RALDH1	RALDH3
ER $\alpha$ +	20	15	5
HER2 +	20	20	25
Triple neg.	60	10	25
Total	100	13	21

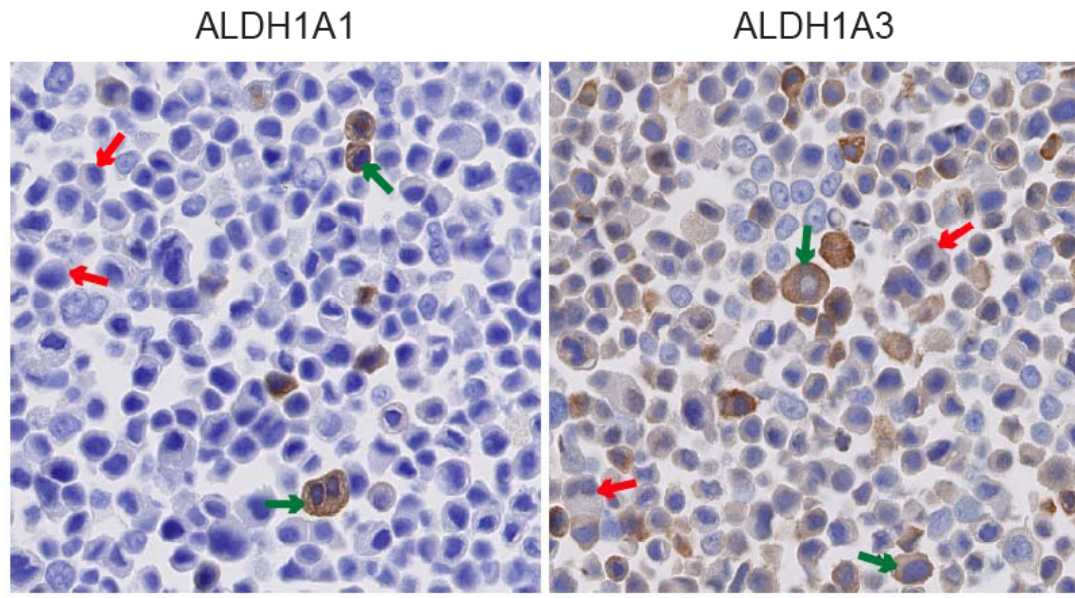
C



**Figure 1**

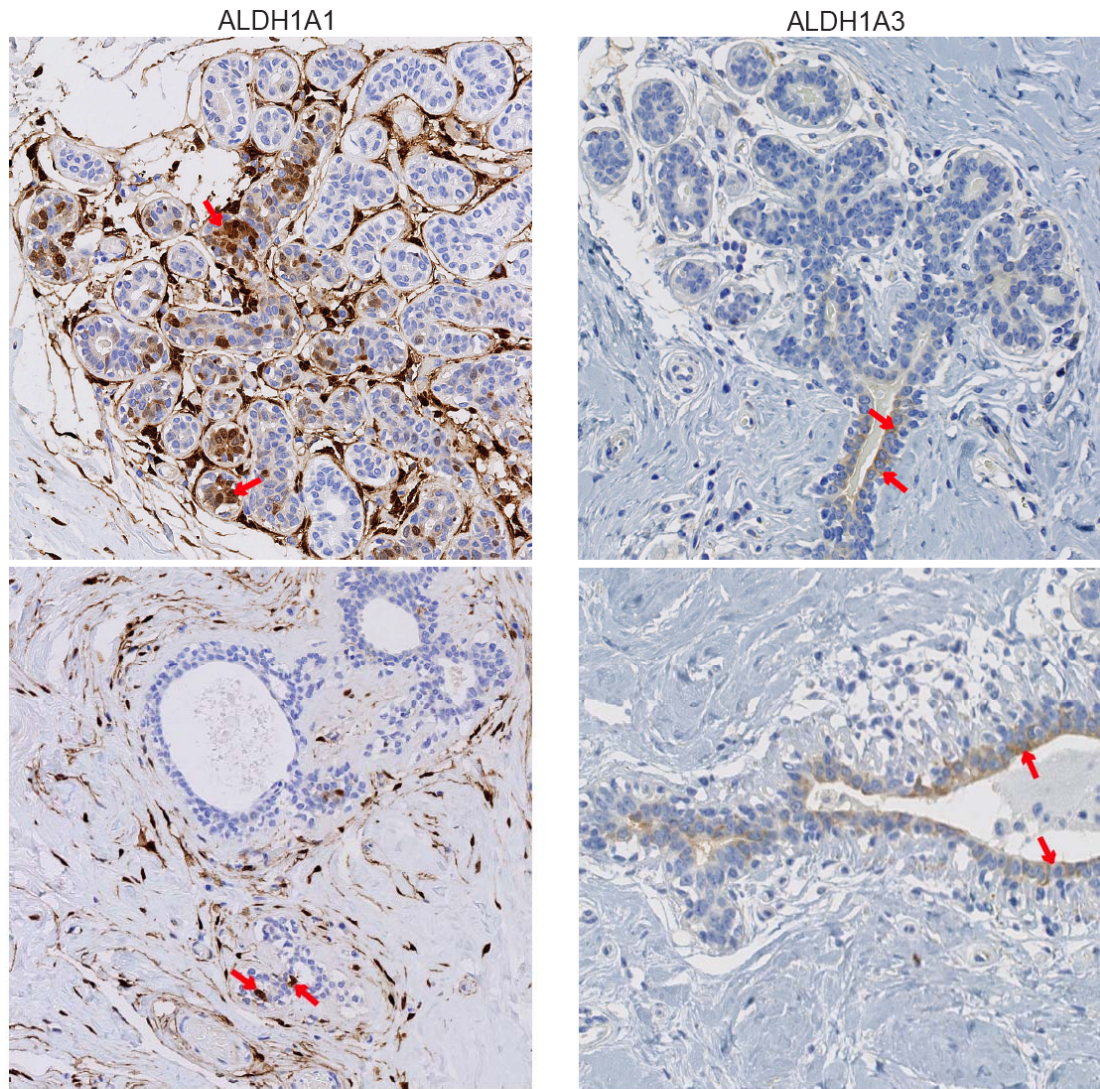
ALDH1A3 and 1 are expressed in a non-overlapping pattern in mammary tumors.





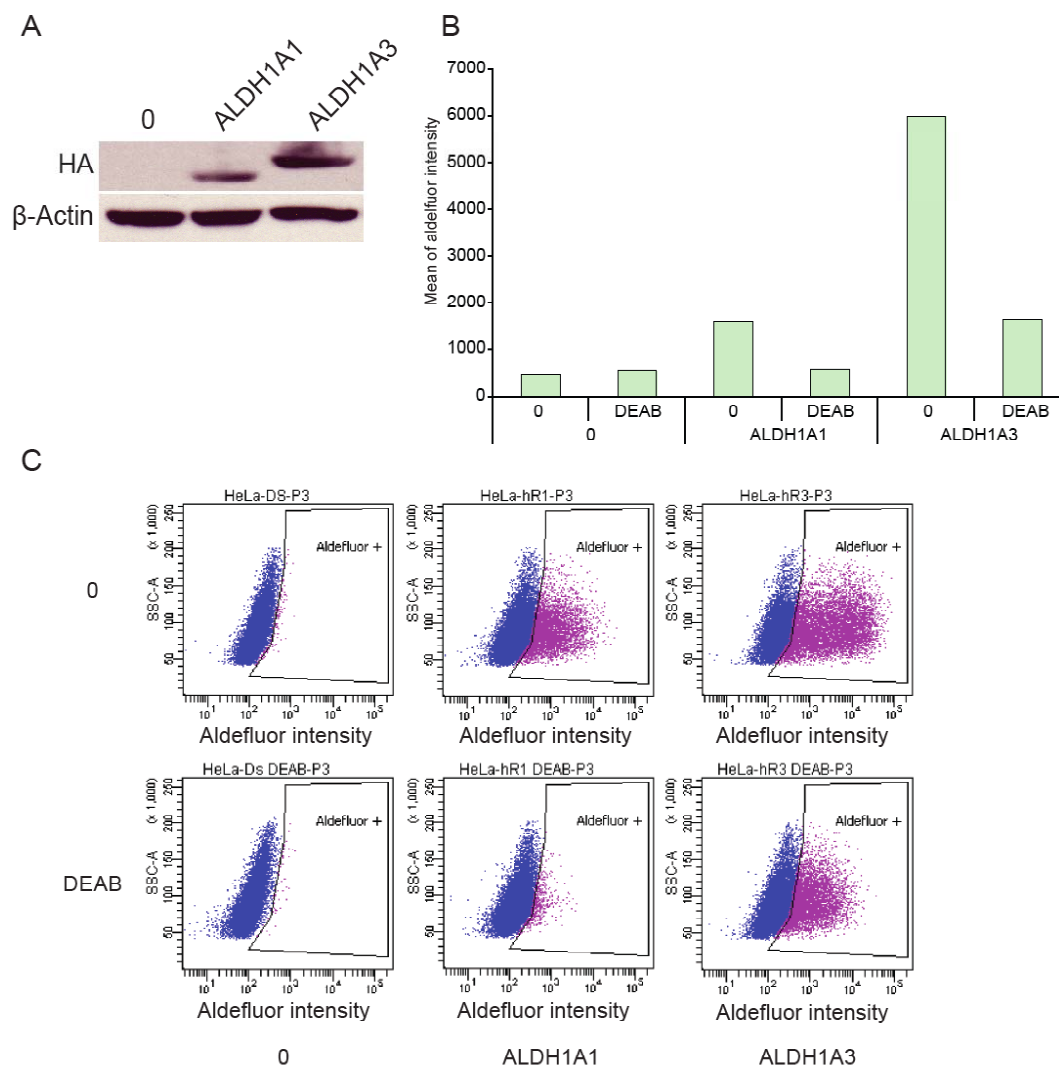
**Figure 2**

Heterogeneous expression of ALDH1A1 and 3 in the cancer cell line SKBR3.



**Figure 3**

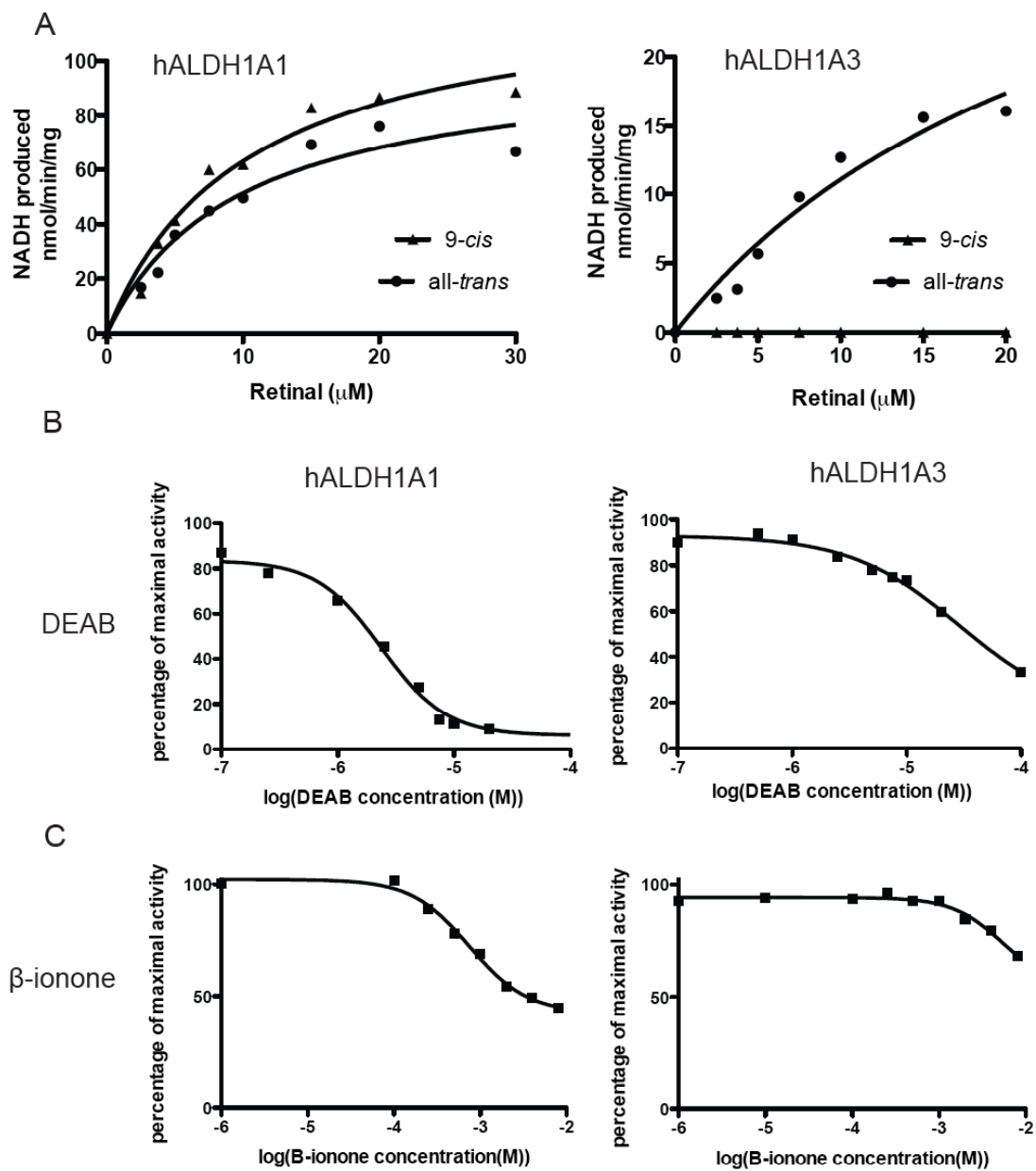
ALDH1A1 and 1A3 are expressed in distinct cell populations in normal mammary epithelium.



**Figure 4**

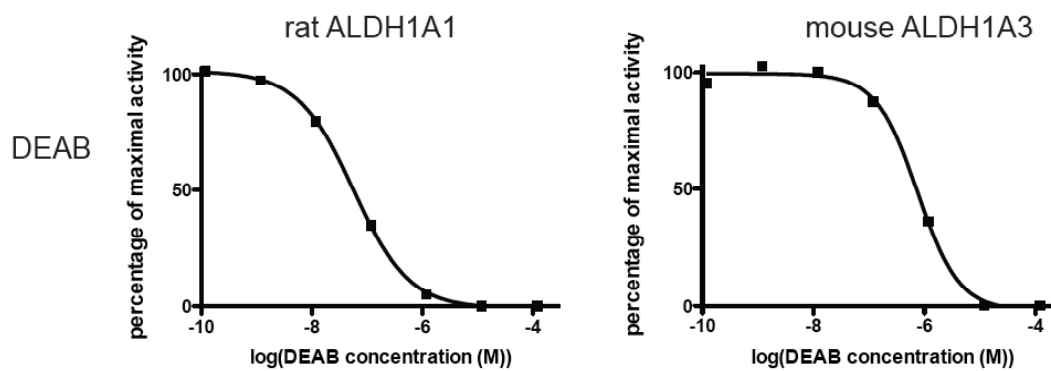
Expression of either ALDH1A1 or ALDH1A3 in HeLa cells yields aldefluor®-bright cell populations.





**Figure 6**

Pure recombinant ALDH1A1 and 1A3 have distinct sensitivities to DEAB and  $\beta$ -ionone *in vitro*.



### Figure supplémentaire

Human ALDH1A1 and ALDH1A3 have different selectivities toward retinal isomers.

## **Discussion**

# 1. Rôle de la synthèse d'AR dans la glande mammaire

## 1.1 La signalisation de l'AR est activée dans la glande mammaire

Il avait été déjà publié que les cellules mammaires normales ont la capacité de métaboliser le rétinol en AR [250, 251]. Mais cette voie restait en fait peu caractérisée et notre premier but était de mieux la décrire dans les cellules de l'épithélium mammaire. Nous avons choisi de travailler sur un large panel de lignées cellulaires représentatif des différentes classes répertoriées à ce jour, c'est-à-dire les cellules cancéreuses de type luminal, basal A, et basal B [458]. Il faut noter que selon cette classification, la catégorie de cellules HER2-positives est incluse dans le type luminal (ce sont les cellules SKBR3, les MDA-MB-361 et les BT-474). À des fins de comparaison, nous avons inclus à notre panel des cellules normales HMEC ainsi que deux lignées immortalisées (mais non-cancéreuses), les cellules 184B5 et MCF10F.

### 1.1.1 L'expression de RALDH3 corrèle avec la capacité de synthèse de l'AR dans les cellules en culture

Nos études ont confirmé que seules les cellules mammaires normales ou immortalisées, et dans une moindre mesure les cellules cancéreuses de type basal A, synthétisent de l'AR lorsque du rétinol est ajouté à leur milieu de culture (article 2 figure 1B). En revanche, de façon frappante, les cellules cancéreuses de type luminal (et basal B) ont toutes une très faible capacité de synthèse de l'AR. Bien entendu il est possible que la faible quantité d'AR détectée soit due à un niveau de catabolisme plus important, par exemple en raison de la présence d'enzymes CYP26. Toutefois, R. Mira-Y-Lopez et ses collègues avaient montré que le traitement avec un inhibiteur de CYP26A1, le liarozole, n'avait aucun effet sur la quantité d'AR produite à partir du rétinol par les cellules T47D et MCF-7, deux des lignées luminales de notre panel. Cela suggère que la déficience serait peut-être plus en amont, au niveau de la synthèse de l'AR elle-même. C'est d'ailleurs ce que semblent indiquer les résultats de B.N. Rexer qui avait montré en 2001, que les cellules mammaires non-cancéreuses



MTSV1.7, qui synthétisent l'AR à partir du rétinol, expriment RALDH3 tandis que les cellules MCF-7 ne l'expriment pas. Le défaut de synthèse pourrait donc être dû, au moins en partie, à un défaut d'oxydation du rétinol en AR [250].

Nous avons quantifié l'activité d'oxydation du rétinol en AR *in vitro* dans les lysats protéiques des lignées de notre panel, et les résultats obtenus semblent confirmer notre hypothèse (article 2, figure 1A). En effet, cette expérience nous a permis de montrer qu'il y avait une excellente corrélation entre la capacité d'oxydation de l'AR *in vitro* et la capacité de production d'AR à partir du rétinol des cellules en culture. Les cellules HMEC, MCF10F ou 184B5 ont montré la plus forte activité d'oxydation du rétinol *in vitro* tandis qu'elle est comparativement beaucoup plus faible chez les cellules cancéreuses de type luminal ou basal B.

Pour déterminer quelles RALDH sont responsables de cette activité nous avons analysé les niveaux d'expression de RALDH1 et 3 par immuno-blot de type western ainsi que de RALDH1, 2 et 3 et 4 par PCR quantitative dans les cellules de notre panel. Nous avons observé une excellente corrélation entre la capacité de synthèse de l'AR des lignées et le niveau d'expression de RALDH3, en particulier dans les cellules normales et immortalisées. En revanche, de façon intéressante, RALDH1 et 2 n'y sont pas exprimées à un niveau détectable. Cela suggère que c'est RALDH3 qui est responsable de la synthèse d'AR dans les cellules mammaires non-cancéreuses en culture (nous n'avons pas détecté de niveaux significatifs de RALDH4 dans les cellules mammaires). Il est à noter que les cellules qui expriment RALDH1 comme les BT-474 ne synthétisent pas l'AR tandis que les cellules MDA-MB-468 qui expriment à la fois RALDH1, 2 et 3 ne synthétisent pas plus d'AR que les cellules qui n'expriment que RALDH3 comme les BT-20 ou les 184B5. La présence de RALDH3 semble donc décisive.

### 1.1.2 RALDH3 semble être impliquée dans la synthèse d'AR dans la glande mammaire de souris

Cependant les expériences effectuées sur des lignées cellulaires ne sont pas à l'abri de biais dus aux conditions dans lesquelles elles sont cultivées, qui sont éloignées de celles dans lesquelles elles se trouvent dans leur tissu d'origine. Pour éviter cet écueil nous avons analysé l'expression de RALDH1 et 3 par immunohistochimie (IHC) sur des coupes non-pathologiques de glandes mammaires de souris. À cette fin, nous avons utilisé une souche de souris génétiquement modifiée exprimant le transgène LacZ sous la dépendance d'un promoteur minimal RARE, qui est activé par l'AR. Nous observons chez la souris, RALDH3 est exprimée dans la couche luminale de l'épithélium mammaire, mais pas dans la couche basale comme le montre un marquage simultané de RALDH3 et de la *smooth muscle actin* (SMA), un marqueur des cellules myo-épithéliales, situées dans la couche basale (article 2, figure 3). Un marquage par IHC à l'aide d'un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -galactosidase de coupes de glandes mammaires de ces mêmes souris montre que l'expression du transgène LacZ est restreinte à la couche luminale, donc aux mêmes sites où nous avons détecté l'expression de RALDH3. De plus nous avons observé que RALDH1 ne semble pas exprimée dans les cellules de l'épithélium mammaire chez la souris. Nous ne sommes pas en possession d'un anticorps spécifique de RALDH2, son schéma d'expression dans la glande mammaire reste donc inconnu. Précisons qu'il sera tout de même important de déterminer si RALDH2 y est exprimée. En l'absence d'anticorps reconnaissant spécifiquement cette enzyme, nous pourrions procéder, par exemple, à des expériences d'hybridation *in situ* avec des sondes nucléotidiques marquées. Cependant RALDH2 n'a pas été détectée chez les cellules mammaires normales ou immortalisée ce qui plaide pour une absence d'expression dans la glande mammaire. Toutefois l'une des lignées basale A de notre panel exprime RALDH2. La présence de RALDH2 dans la glande mammaire reste donc pour l'instant une question en suspend.

Si l'on récapitule les données obtenues par IHC, nous pouvons conclure que RALDH3, mais pas 1, est exprimée aux sites de signalisation de l'AR dans l'épithélium mammaire de souris, c'est-à-dire dans la couche luminale. Cela suggère que RALDH3 pourrait être impliquée dans la synthèse d'AR *in vivo*. Nous savons que dans certains cas l'AR peut agir de façon paracrine, ou du moins de façon non-cellule autonome [143, 144, 459]. Pourtant nous n'avons jamais observé l'expression de la  $\beta$ -galactosidase dans les cellules myo-épithéliales adjacentes aux cellules lumineales exprimant RALDH3. Cela suggère l'existence d'une forte compartimentalisation de la signalisation, et peut être de la production, par l'AR.

Il faudra, bien entendu, confirmer ce résultat par exemple par immunofluorescence sur les coupes de glandes mammaires de souris. Cela pourrait indiquer qu'il existe un mécanisme qui restreint l'action de l'AR aux cellules du compartiment luminal. Nous pourrions aussi procéder à la microdissection des cellules de chaque couche de l'épithélium chez la souris, mais aussi chez l'humain, et déterminer la présence éventuelle d'AR par spectrométrie de masse dans les cellules individuelles. Ceci est envisageable car ce type d'analyse ultra-sensible (bien plus que la HPLC que nous utilisons) a été développée et utilisée avec succès pour doser l'AR dans différents tissus chez la souris par Joseph Napoli et ses collaborateurs [28, 460]. Ce type d'approche aurait l'intérêt majeur de nous permettre d'accéder directement au niveau d'AR présent dans les différents compartiments cellulaires de la glande mammaire, ce qui est probablement le résultat qui donnerait plus de poids à notre travail.

Nous avons aussi procédé à des marquages par IHC pour détecter les sites d'expression de RALDH1 et 3 dans des échantillons de glandes mammaires humaines non-pathologiques. Comme chez la souris, RALDH3 est exprimée dans la couche luminale mais pas basale, et de façon prédominante dans les tubules. Quant à RALDH1, elle est exprimée, mais dans de rares cellules des tubules et surtout au niveau des lobules terminaux (article 2, figure supplémentaire 2).

## 1.2 Rôle potentiel des RALDH dans le développement et la tumorigenèse mammaire: une question de sensibilité à l'AR

Nous avons obtenu des résultats qui suggèrent pour première fois, que l'AR est synthétisé dans la glande mammaire. Or, plusieurs auteurs ont proposé que la capacité de synthèse d'AR serait faible ou quasi nulle dans plusieurs lignées cellulaires mammaires cancéreuses [250, 251]. Mais les conséquences de cette déficience étaient inconnues.

### 1.2.1 Sensibilité et capacité de synthèse de l'AR sont inversement corrélées chez les cellules cancéreuses

Nous avons voulu vérifier s'il existe une corrélation entre la synthèse d'AR et la sensibilité à ses effets, notamment antiprolifératifs. Nous avons donc effectué des tests de croissance en cultivant toutes les cellules de notre panel en présence de 100 nM d'AR. Comme on peut le constater (figure 1C de l'article 2), la croissance des cellules HMEC et des lignées immortalisées est réprimée par l'AR. Ces dernières sont donc sensibles à cette hormone qu'elles peuvent aussi synthétiser. Les cellules basales A ne sont pas du tout sensibles à l'AR, bien qu'elles puissent le synthétiser. Cette catégorie de cellules représente un cas intéressant. En effet, l'expression de RALDH3 dans des cellules qui ne sont pas sensibles à l'effet de l'AR pose la question de sa fonction. En l'absence de résultats nous ne pouvons que spéculer. Il est possible que l'AR ait un effet que nous n'avons pas détecté. Il se pourrait aussi que RALDH3 ait d'autres substrats que le rétinol. En effet, nous avons vu que les enzymes ALDH sont impliquées dans plusieurs voies métaboliques, parmi lesquelles la détoxification des cellules.

Quant aux cellules luminales, elles sont presque toutes sensibles, voir très sensibles aux effets antiprolifératif de l'AR (comme les SKBR3 par exemple). Ce résultat est très intrigant car il suggère que ces cellules luminales en culture sont sensibles à l'AR, mais qu'en revanche, elles ne le synthétisent pas. On peut se

demander si la faible synthèse d'AR, probablement en raison de l'expression faible de RALDH3, ne pourrait pas représenter un mécanisme d'échappement aux effets antiprolifératifs de l'AR qui favoriserait la croissance des tumeurs. Précisons que des résultats que nous ne présentons pas ici montrent que la croissance des cellules luminales n'est pas affectée par 100 nM de rétinol (alors que la croissance des cellules HMEC ou immortalisées est fortement ralentie dans les mêmes conditions).

En fait, on sait que le récepteur aux estrogènes ER $\alpha$  est le marqueur le plus caractéristique des tumeurs et lignées cellulaires luminales [423, 424, 461]. Or, les estrogènes ont justement la propriété d'activer la prolifération des lignées mammaires luminales cancéreuses qui expriment ER $\alpha$  [462].

Il est tentant d'imaginer, à ce point-ci de la discussion, que les estrogènes, via ER $\alpha$ , pourraient contribuer à maintenir une expression faible de RALDH3 dans les cellules cancéreuses luminales, sensibles à l'AR, ce qui leur permettrait de proliférer en présence du rétinol présent dans la circulation sanguine. Cela pourrait représenter l'un des mécanismes par lesquels les estrogènes maintiennent un niveau de prolifération élevé chez les cellules cancéreuses luminales. Pour que ce modèle soit plausible, il faudrait toutefois que le niveau d'expression de RALDH3 soit plus faible dans les tumeurs luminales qui expriment ER $\alpha$  que dans les autres types de tumeurs qui ne l'expriment pas.

### 1.2.2 L'expression de RALDH3 est plus faible dans les tumeurs ER $\alpha$ +

Pour tester cette hypothèse, nous avons détecté l'expression de RALDH3 et de ER $\alpha$  par IHC avec des anticorps spécifiques, tout d'abord dans des coupes de tumeurs luminales humaines individuelles. Les résultats de ces marquages (figure 5) suggèrent que les expressions de ER $\alpha$  et de RALDH3 sont mutuellement exclusives dans les tumeurs mammaires. En particulier, on observe que les cellules qui expriment ER $\alpha$  n'expriment jamais RALDH3. Ceci s'accorde avec notre modèle

hypothétique au sein de tumeurs individuelles. Mais qu'en est-il sur un plus grand nombre de tumeurs?

Nous avons détecté l'expression de RALDH3 dans des coupes d'une micromatrice de tissus incluant des échantillons de 140 tumeurs mammaires comprenant notamment 41 tumeurs ER $\alpha$ -positives (figure 6). Nous avons en effet constaté que RALDH3 est notablement moins exprimée dans les tumeurs ER $\alpha$ -positives que dans les autres types de tumeurs (HER2-positives et triples-négatives). Cela est confirmé notre analyse des données publiées de profils d'expression génétique de larges groupes de tumeurs mammaires (article 2, figure 6A). Ensemble ces résultats démontrent de façon claire qu'il semble y avoir une corrélation négative entre l'expression de ER $\alpha$  et de RALDH3 dans les tumeurs mammaires.

La faible expression de RALDH3 dans les tumeurs qui expriment le récepteur des estrogènes suggère que ces tumeurs, à l'instar des cellules luminales en culture, sont sensibles aux effets de l'AR. Or, il semble justement que le récepteur RAR $\alpha$  soit spécifiquement exprimé dans les tumeurs ER $\alpha$ -positives [463]. Il a d'ailleurs été démontré par plusieurs auteurs que les estrogènes induisent l'expression de RAR $\alpha$  [464] et que la sensibilité des cellules cancéreuses mammaires aux effets antiprolifératifs de l'AR corrèle avec l'expression de ce récepteur [465]. Ces résultats sont surprenants, car ils suggèrent que par leur action, les estrogènes induisent une plus grande sensibilité à l'AR des cellules des tumeurs luminales. Or l'AR est une hormone susceptible de limiter la croissance de la tumeur, alors que les estrogènes sont plutôt connus pour induire la croissance des tumeurs luminales. La raison pour laquelle l'expression de RAR $\alpha$  est induite par les estrogènes reste toutefois obscure. Des auteurs ont montré que l'expression RAR $\alpha$  est requise pour l'induction de la prolifération des cellules cancéreuses luminales par les estrogènes [466]. Selon le mécanisme proposé, lorsqu'il n'est pas lié à son ligand, RAR $\alpha$  serait un coactivateur de ER $\alpha$ . Bien que ce résultat reste à confirmer, il s'accorde bien avec un modèle hypothétique où les estrogènes induiraient l'expression de RAR $\alpha$  et simultanément une diminution de l'expression de RALDH3, empêchant la synthèse d'AR dans ces

cellules qui y sont probablement très sensibles. Cela pourrait représenter un nouveau mécanisme d'action des estrogènes sur les cellules des tumeurs lumineales. Pour que ce modèle soit plausible, il faut toutefois qu'ils puissent agir sur le niveau d'expression de RALDH3.

### 1.2.3 L'action estrogènes pourrait expliquer faible expression de RALDH3 dans les tumeurs lumineales

Nous avons donc décidé de mener des investigations pour tenter d'élucider le mécanisme par lequel l'expression de RALDH3 est maintenue à un faible niveau dans les tumeurs lumineales. Une action des estrogènes au niveau transcriptionnel sur le gène *Raldh3* était une possibilité comme nous l'avons vu. Pour la tester, nous avons traité des cellules lumineales MCF-7 et T47D avec de l'estradiol ( $E_2$ ) le ligand de  $ER\alpha$ , avec de l'AR, le produit de RALDH3, ou avec une combinaison de ces deux hormones (figure 8A-C et supplémentaire 7). Nous avons pu déterminer que l'expression de RALDH3 est induite par l'AR dans ces deux lignées tandis que l' $E_2$  a la propriété de fortement la réprimer, même en présence d'AR. Cela signifie que l'action des estrogènes pourrait expliquer une faible expression de RALDH3 dans les tumeurs lumineales. D'autre part, l'induction de l'expression de RALDH3 par l'AR suggère un mécanisme de rétrocontrôle positif de l'AR sur l'expression de l'enzyme qui le synthétise. L' $E_2$  semble très efficace à réprimer le niveau d'expression induit par l'AR aussi bien que basal de RALDH3, dans les deux lignées cellulaires MCF-7 et T47D. Cela représente potentiellement un processus très efficace de suppression de la synthèse d'AR dans la tumeur. Les mécanismes mis en jeu restent toutefois à caractériser. Cependant des auteurs ont proposé récemment qu'il pourrait exister un antagonisme au niveau génomique entre la voie de l'AR et celle des estrogènes [99]. Selon ce modèle les sites de liaison dans le génome des récepteurs nucléaires de l'AR (RAR-RXR) et des estrogènes  $ER\alpha$  se recouperaient souvent (ou du moins seraient très proches physiquement), ce qui expliquerait que l'AR et l' $E_2$  régulent l'expression de plusieurs gènes dans des sens opposés. Ce mécanisme pourrait s'appliquer au cas de RALDH3. Nous n'avons pas caractérisé les séquences régulatrices du gène

Raldh3, mais il sera important de le faire, notamment pour déterminer s'il y existe des sites de liaison pour les récepteurs ER $\alpha$  et RAR-RXR. L'utilisation d'un inhibiteur de la traduction comme la cycloheximide permettrait aussi de déterminer si l'AR et l'E<sub>2</sub> ont des effets directs ou indirects sur l'expression de RALDH3 (via l'expression préalable de protéines médiatrices de leurs effets, comme des facteurs de transcription, eux mêmes cibles directes de l'AR ou de l'E<sub>2</sub>). Des résultats préliminaires que nous avons obtenu dans les cellules MCF-7 indiquent que la répression de l'expression de RALDH3 par E<sub>2</sub> nécessite la présence d'ER $\alpha$ , car la suppression de son expression par une approche par siRNA abolit en grande partie l'effet de l'E<sub>2</sub>. En outre, cet effet de l'E<sub>2</sub> sur l'expression de RALDH3 semble direct car il est observable en absence aussi bien qu'en présence d'un inhibiteur de la traduction (cycloheximide) d'après nos résultats les plus récents. La technique d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) pourra être employée, par exemple pour analyser la dynamique de liaison éventuelle des récepteurs sur les séquences régulatrices de l'expression de RALDH3, en fonction des hormones qui sont présentes (E<sub>2</sub>, RA ou les deux simultanément) ainsi que pour préciser le mécanisme mis en jeu lors de la répression de l'expression de RALDH3 par E<sub>2</sub> (il est précisé que des sites de liaison de ER $\alpha$  ont été identifiés par des expériences de ChIP-on-chip chez les MCF-7). Il est connu que l'E<sub>2</sub> peut induire la répression de l'expression de certains gènes via le recrutement de corépresseurs (NCoR et SMRT ou LCoR et RIP14 par exemple) [111, 338, 467, 468]. Le recrutement de ces cofacteurs pourra être quantifié par CHIP sur le promoteur de RALDH3 afin de confirmer éventuellement cette hypothèse.

Quoi qu'il en soit, nos résultats montrent qu'il est plausible que les estrogènes répriment l'expression de RALDH3 dans les cellules cancéreuses lumineales. Cela aurait pour effet de diminuer la synthèse d'AR et donc de lever un frein susceptible de s'opposer à la prolifération de ces cellules sensibles à l'AR. En outre d'après le paradigme actuel, en l'absence d'AR, les récepteurs à l'AR sont liés à l'ADN ou il auraient plutôt une activité de répression de la transcription [82, 85]. Il est donc possible que l'expression de RAR $\alpha$  en l'absence de RALDH3 et donc de synthèse



d'AR conduise à une répression accentuée de l'expression des gènes cibles de l'AR. Ce phénomène pourrait donc aussi contribuer à l'induction de la prolifération des cellules luminales par E2. Une façon de tester cette hypothèse serait d'analyser le transcriptome de lignées cellulaires telles que les MCF-7 ou les ZR-75 ou l'expression de RAR $\alpha$  serait diminuée par l'utilisation de shRNA spécifiques afin de déterminer le statut des gènes cibles de l'AR (un traitement à l'AR de ces cellules en l'absence de shRNA contre RAR $\alpha$  offrirait un point de comparaison).

#### 1.2.4 L'expression de RALDH3 mais pas de RALDH1 diminue la croissance des cellules cancéreuses luminales

Pour vérifier ce dernier point, nous avons exprimé RALDH3 transitoirement dans deux lignées mammaires cancéreuses luminales, les SKBR3 et les ZR75. Nous avons aussi exprimé RALDH1 à fin de comparaison car elle a été détectée dans la glande mammaire humaine (articles 2, 3 et[214]). Nous avons aussi exprimé des mutants catalytiquement inactifs de RALDH1 et 3 générés par mutation de la cystéine catalytique de ces deux enzymes (respectivement C303 chez RALDH1 et C314 chez RALDH3, mutées en alanine, ce qui empêche la formation de l'intermédiaire thiohémiacétal entre le rétinol et cette alanine). L'absence totale d'activité mesurable chez les mutants avait été vérifiée auparavant par des tests enzymatiques *in vitro*. Enfin nous avons pris la précaution de fusionner les séquences codantes de ces enzymes à une étiquette HA, dans le but de comparer leurs niveaux relatifs d'expression. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides codant ces différentes protéines puis cultivées dans du milieu contenant 10 % de sérum de veau fœtal qui apporte environ 100 nM de rétinol aux cellules. Le précurseur de l'AR est donc présent dans le milieu de culture, cela a été vérifié par l'analyse HPLC du serum utilisé.

L'expression de RALDH3 mais pas de RALDH1 à des niveaux similaires ou des mutants inactifs arrête la croissance des cellules SKBR3 et ZR75 (article 2, figure 7 et supplémentaire 5) presque aussi efficacement que le traitement de ces cellules avec

100 nM d'AR. Le fait que les mutants n'aient pas d'effet démontre que celui qui est observé lorsque RALDH3 est exprimée est dû à son activité enzymatique, donc possiblement à la synthèse d'AR. On observe d'ailleurs que les cellules SKBR3 qui expriment RALDH3 gagnent la capacité à synthétiser l'AR à partir de rétinol, comparativement aux cellules qui expriment les mutants inactifs ou RALDH1. Cela se traduit logiquement par l'induction spécifique de l'expression de gènes cibles de l'AR, comme SOX9, CYP26A1, RAR $\beta$ 2 et FOXA1. De plus, l'expression stable de RALDH3 dans les cellules MCF-7, mais pas de son mutant inactif, diminue la formation de colonies en présence de rétinol, comme le fait l'AR. Cela est en bon accord avec la démonstration que l'expression de RALDH3 dans les MCF-7 leur permet de synthétiser l'AR à partir du rétinol [250]. Enfin, l'expression de RALDH3 ou de RALDH1 dans les cellules MDA-MB-231, qui sont connues pour être résistantes aux effets antiprolifératifs de l'AR [469], n'a aucun effet observable sur cette lignée. Il est connu l'AR induit un arrêt de croissance mais aussi l'apoptose des cellules mammaires cancéreuses, notamment chez les cellules MCF-7, SKBR3 et ZR-75 [470, 471]. Il est donc possible que l'apoptose participe à l'arrêt de croissance observé chez ces cellules exprimant RALDH3 (augmentation de la fraction de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire). Ce phénomène pourra être quantifié par essai TUNNEL par exemple.

Ces expériences démontrent que la déficience de la synthèse d'AR dans les cellules luminales est due à la faible expression de RALDH3, donc que le défaut est localisé au niveau de l'oxydation du rétinol en AR, et pas de la première étape de la synthèse, l'oxydation du rétinol en rétinol. Cela suggère en outre que les cellules cancéreuses luminales pourraient tout de même synthétiser du rétinol en présence de rétinol. Or il a été montré que le rétinol pouvait avoir une certaine activité biologique (notamment sur la régulation du métabolisme énergétique), en agissant comme antagoniste du récepteurs nucléaire PPAR $\gamma$ , qui est aussi exprimé dans certaines lignées mammaires [220]. Il serait intéressant d'étudier l'effet du rétinol sur les lignées luminales, car l'activation de PPAR $\gamma$ , chez les cellules MCF-7 par exemple, bloque leur prolifération et peut aussi induire l'apoptose [472, 473].

### 1.3 Plusieurs RALDH avec des schémas d'expression différents dans la glande mammaire

Nos données suggèrent que RALDH1 et RALDH3 pourraient avoir des effets différents sur la croissance des cellules mammaires. Nous discuterons plus loin les raisons et les conséquences potentielles de ce résultat, toutefois cela soulève une nouvelle question, celle des patrons d'expression relatifs de ces deux enzymes dans la glande mammaire. En particulier, il serait important de savoir s'ils sont mutuellement exclusifs ou se recourent, partiellement ou bien totalement, afin de mieux cerner les rôles respectifs de ces deux enzymes.

#### 1.3.1 Dans l'épithélium mammaire normal

Nos résultats semblent suggérer que RALDH1 est exprimée dans de rares cellules et surtout au niveau des tubules terminaux tandis que RALDH3 est exprimée dans la couche luminale, essentiellement dans les tubules et peu dans les lobules (articles 2 et 3). Ceci est en accord avec les résultats d'autres auteurs à propos de RALDH1 [214] et indique que RALDH1 et 3 pourraient être exprimées dans des types cellulaires différents de l'épithélium mammaire humain. En effet, il est connu que les cellules des tubules et des lobules sont phénotypiquement différentes, étant peut-être deux types distincts de cellules de la hiérarchie de l'épithélium mammaire [264]. Toutefois nous devons confirmer cette expression différencielle par des doubles marquages par IHC de RALDH1 et RALDH3.

Le fait que nous n'ayons pas détecté l'expression de RALDH1 dans l'épithélium mammaire chez la souris est une donnée intrigante. En effet, il a été suggéré que RALDH1 était un marqueur de cellules souches mammaires chez l'homme [250]. Or sa suppression génétique chez la souris n'a pas d'effets répertoriés sur la glande mammaire de ces animaux [229]. La fonction éventuelle de RALDH1 dans les cellules souches chez l'homme est inconnue. Toutefois nous pouvons maintenant

proposer que l'absence de phénotype observé chez les souris RALDH1<sup>-/-</sup> soit explicable par le fait que cette protéine n'y est pas exprimée. Cette importante différence dans le schéma d'expression de RALDH1 doit être tempérée par le fait qu'il existe une différence majeure entre les glandes mammaires murines et humaines. Lobules terminaux, où RALDH1 est exprimée, sont présent en tout temps chez l'humain, alors qu'ils apparaissent seulement au moment de la lactation chez la souris. Il faudrait donc analyser des glandes mammaires de souris allaitantes.

### 1.3.2 Dans les lignées tumorales mammaires

Il existe des lignées mammaires cancéreuses comme les SKBR3 qui expriment RALDH1 et RALDH3, toutes deux à un faible niveau toutefois (voir article 2). Cependant nous avons pu déterminer par IHC que la faible expression de ces deux enzymes n'est pas due à une expression modérée et homogène dans toutes les cellules mais plutôt à une expression très hétérogène, avec des cellules qui expriment fortement et d'autres cellules qui n'expriment pas du tout RALDH1 et 3 (article 3 figure 2). Or il est connu que les lignées cellulaires mammaires en culture sont hautement hétérogènes [393]. S'il s'avère que les cellules qui expriment RALDH1 et RALDH3 ne sont effectivement pas les mêmes, elles pourraient représenter deux populations distinctes de cellules de la hiérarchie des cellules de la glande mammaire. Ce résultat devra être bien sûr confirmé dans d'autres lignées. Nous pourrions aussi procéder à des expériences d'IHC (ainsi que d'immunofluorescence) en marquant simultanément RALDH1 et 3 pour déterminer si les cellules qui expriment RALDH1 et 3 sont les mêmes. Si ce n'est pas le cas nous pourrions séparer les populations exprimant différemment ces deux enzymes par tri cellulaire en FACS (*fluorescence activated cell sorting*) afin de les isoler et de les caractériser, par exemple par analyse de leur transcriptome à l'aide de puces à ADN.

### 1.3.3 Dans les tumeurs

Si RALDH1 et 3 sont exprimées dans des populations de cellules distinctes dans le tissu normal, il apparaît plausible que ces deux populations puissent donner naissance à des tumeurs de types différents, donc qui n'expriment pas RALDH1 et 3 en même temps.

Nous avons analysé l'expression de RALDH1 et de RALDH3 par IHC dans des coupes de matrices de tissu comprenant des échantillons de 100 tumeurs mammaires (figure 1). Une première remarque intéressante est que les tumeurs classées comme exprimant fortement RALDH1 ou RALDH3 (score  $\geq 2$ ) ne représentent qu'une faible proportion du total des tumeurs. En effet 67 % d'entre elles expriment faiblement ces deux enzymes (score  $< 2$ ). Une seconde remarque est que la plupart tumeurs qui expriment l'une des deux enzymes fortement n'expriment pas l'autre. Cela indique qu'il existe une forte hétérogénéité de l'expression de RALDH1 et 3 parmi les tumeurs. Les raisons et les conséquences biologiques de ces différences ne sont pas connues, essentiellement en raison du manque de résultats sur les rôles respectifs de ces deux enzymes dans la glande mammaire normale et notamment son développement. Cependant ce résultat suggère qu'il est plausible que les expressions de RALDH1 et 3 délimitent des groupes différents de tumeurs.

## 2. Les RALDH : plusieurs enzymes aux fonctions spécifiques dans la glande mammaire

### 2.1 Les RALDH ont des spécificités de substrats différentes

Nous avons vu qu'il existe plusieurs isomères de l'AR, notamment le tout-*trans*, qui est le ligand des RAR, et le 9-*cis*, dont la présence naturelle *in vivo* est encore discutée mais qui lie aussi bien les RAR que les RXR. La question se pose alors de la possibilité de l'existence d'une voie de synthèse pour ces deux isomères de l'AR à partir respectivement du rétinol tout-*trans* et du 9-*cis*.

Il a été rapporté que RALDH1 et 2 sont toutes deux actives avec l'isomère *tout-trans* aussi bien que *9-cis* du rétinol [216, 474, 475]. Nous confirmons maintenant que RALDH3 est bien active avec l'isomère *tout-trans* et nous ajoutons qu'elle n'est pas active avec le *9-cis*. Cette enzyme n'est donc probablement pas impliquée dans une hypothétique voie de synthèse d'AR *9-cis in vivo*. RALDH4, au contraire, n'est active qu'avec l'isomère *9-cis* du rétinol mais pas avec le *tout-trans*. Si une voie de synthèse de l'AR *9-cis* est mise en évidence, cette enzyme pourrait y participer. Toutefois jusqu'ici les preuves de l'existence d'une telle voie manquent, bien que plusieurs enzymes et protéines impliquées dans le transport, la synthèse et le catabolisme de l'AR aient une activité avec les isomères *9-cis* de différents rétinoïdes [161].

## 2.2 Bases moléculaires de la reconnaissance du substrat

Le site actif des RALDH est un tunnel relativement étroit et profond. Ses parois sont constituées d'acides aminés provenant de plusieurs domaines de la protéine. La fonction aldéhyde du substrat rétinol doit pénétrer jusqu'au fond du tunnel pour se trouver à proximité des résidus catalytiques qui y sont situés. Selon un modèle en vigueur aujourd'hui, les acides aminés qui constituent les parois du tunnel seraient importants pour la reconnaissance du substrat par les RALDH [476-478].

### 2.2.1 Sélectivité *9-cis*/*tout-trans* des RALDH

Les RALDH sont des enzymes très conservées, il existe en effet une forte identité (environ 70%) entre les séquences de RALDH1, 2 et 3 [210]. Un résultat important est que RALDH1 et 2 sont actives avec les isomères *9-cis* et *tout-trans* du rétinol tandis que RALDH3 n'est active qu'avec le *tout-trans* et RALDH4, le *9-cis*. Cela suggère des différences majeures dans les acides aminés constituant les parois du tunnel car contrairement à l'isomère *tout-trans* qui est linéaire, le *9-cis* est une molécule coudée, donc beaucoup plus encombrante, ce qui est susceptible de créer

des conflits stériques lors de l'entrée de ce substrat dans le site actif des RALDH. Notre laboratoire avait montré en 2002 que chez RALDH1, il existe des groupes de résidus distincts qui sont responsables de la sélectivité pour le rétinol 9-*cis* ou pour le tout-*trans* [209]. Étant donné le très haut niveau d'identité entre les différentes RALDH, les acides aminés du site actif responsables de ces différences de sélectivité sont probablement en nombre restreint. Cela ouvre la possibilité d'études par mutagenèse afin de mieux comprendre les bases moléculaires de ces différences de sélectivité entre les différentes RALDH. Nous avons aussi commencé des études par modélisation des RALDH *in silico* pour et il existe des données cristallographique qui pourraient aider à y parvenir.

### 2.2.2 Données structurales

En effet, plusieurs auteurs ont pu résoudre les structures cristallographiques de RALDH1 et de RALDH2 (mais pas de RALDH3 et 4) [476, 477, 479]. Ces deux protéines ont été cristallisées en présence de leur cofacteur  $\text{NAD}^+$  mais malheureusement pas du substrat rétinol. L'une des conclusions importantes des études cristallographiques est que l'un des sites majeurs de reconnaissance du substrat chez RALDH1 et 2 est probablement le cycle  $\beta$ -ionone du rétinol. Notre étude nous a permis de montrer que la  $\beta$ -ionone inhibe de façon compétitive l'activité de RALDH4 ce qui suggère que cette partie du rétinol est aussi un site de reconnaissance important chez cette enzyme. Par contre, et de façon surprenante, la  $\beta$ -ionone n'a pas d'effet important sur l'activité de RALDH3 (que ce soit l'orthologue humain ou murin). Nous montrons aussi que RALDH1 est inhibée plus efficacement que RALDH3 par la  $\beta$ -ionone. Cela indique que RALDH3 pourrait reconnaître le rétinol d'une façon différente de RALDH1, 2 et 4. Cette hypothèse a d'ailleurs été renforcée par C.E. Graham et ses collègues qui ont suggéré par la modélisation *in silico* de RALDH3 combinée à des méthodes enzymologiques, que la chaîne linéaire poly-isoprènes est probablement la seule partie du rétinol en contact avec le site actif de cette enzyme [210]. L'obtention de cristaux de RALDH3 pourrait permettre de préciser les mécanismes de reconnaissance du substrat mis en jeu. Nous

avons d'ores et déjà pu obtenir des cristaux de RALDH1 et 3 lors de criblages de conditions de cristallisation. Nous avons aussi cristallisé des mutants de RALDH1 et 3 qui pourraient nous aider à obtenir les structures tridimensionnelles de ces enzymes en complexe avec le rétinol. En effet, chez ces mutants nous avons muté le glutamate catalytique E280 en valine. Rappelons qu'il s'agirait de la base qui activerait une molécule d'eau chargée de l'hydrolyse de l'intermédiaire thiohémiacétal (formé entre la cystéine catalytique 302 et le rétinol) [210]. L'analyse de ces mutants de RALDH1 et 3 démontre qu'ils sont effectivement dépourvus d'activité enzymatique. Cela suggère que le rétinol serait capturé dans le site actif, sous la forme de l'intermédiaire rétinol-C302-Enzyme. Cela pourra être vérifié par fluorescence du tryptophane, car plusieurs sont situés aux abords du site actif.

## 2.3 Les RALDH synthétisent l'AR avec des efficacités différentes

### 2.3.1 RALDH1 est moins efficace que RALDH3 pour catalyser la synthèse d'AR dans les cellules

Il est important de noter que l'expression de RALDH1 à un niveau similaire à celui de RALDH3 n'a que peu d'effet sur les cellules, notamment sur la capacité de synthèse d'AR par les cellules à partir du rétinol présent dans le milieu de culture. Chez les cellules ZR75 lorsque l'on augmente la concentration de rétinol dans le milieu, l'effet différentiel de l'expression de RALDH1 et 3 s'estompe. Cela démontre bien que RALDH1 est active dans ces cellules, mais moins que RALDH3 (article 2, figure supplémentaire 6). Ce résultat est en bon accord avec le fait que les cellules mammaires qui n'expriment que RALDH1, comme les cellules SKBR3, MDA-MB-361 et BT474, ne synthétisent pas l'AR que ce soit à partir du rétinol ajouté au milieu de culture ou lors de tests d'oxydation du rétinol *in vitro*. Les résultats des caractérisations *in vitro* de ces deux enzymes prennent ici leur sens, car rappelons que RALDH3 semblait beaucoup plus active que RALDH1. Cette différence de niveau d'activité pose la question de leurs rôles respectifs dans la glande mammaire humaine où elles sont toutes deux exprimées.



### 2.3.2 RALDH3 est plus active que RALDH1 *in vitro*

Nos données permettent de constater que, dans les conditions du milieu réactionnel utilisé, RALDH3 semble être le membre de la famille des RALDH qui présente le niveau d'activité le plus élevé. En effet, la vitesse maximale mesurée ( $V_{max}$ ), son efficacité catalytique ( $V_{max}/K_M$ ) ainsi que son activité spécifique sont de très loin les plus élevées parmi les RALDH. Par exemple, RALDH1 a une activité spécifique de 30 pmol de rétinol/min/ $\mu$ g d'enzyme [216], pour RALDH2, cette valeur est de 6 pmol /min/ $\mu$ g [231]. Dans les études que nous avons conduites, pour RALDH4 nous avons obtenu 75 pmol/min/ $\mu$ g et pour RALDH3, 185 pmol /min/ $\mu$ g. Des différences aussi marquées suggèrent que la présence de RALDH3 pourrait permettre une synthèse d'AR plus importante que les autres RALDH en cas de besoin, dans certains contextes physiologiques particuliers. Mais nous ignorons pour l'instant si ces différences ont réellement une pertinence biologique bien que nous ayons déterminé qu'une différence d'activité existe aussi dans les cellules mammaires en culture. Nous avons travaillé jusqu'ici avec les orthologues murins et de rat de ces enzymes. Cependant nous avons obtenu des résultats préliminaires qui indiquent que RALDH1 et 3 humaines ont la même sélectivité de substrat que les orthologues de rat et de souris. Cependant nous n'avons pu déterminer le niveau d'activité de RALDH3 humaine *in vitro* car cette enzyme est hautement instable, lorsqu'elle est pure en solution, elle précipite et agrège spontanément. L'activité enzymatique décroît rapidement après la purification (en quelques minutes à quelques heures). Il faut noter que ce problème existe avec l'orthologue murin de RALDH3 mais nous avons pu trouver des conditions expérimentales qui favorisent sa solubilité. Nous travaillons actuellement à reproduire cela avec l'orthologue humain. Il est à noter que ce problème n'existe pas avec RALDH1, qui est beaucoup plus soluble. Des résultats préliminaires indiquent cependant que la RALDH3 humaine semble aussi plus active que RALDH1 lorsque elles sont exprimées dans les cellules mammaires de type luminal.

Les résultats que nous avons obtenu avec les cellules en culture semblent bien s'accorder avec les données issues de tests enzymatiques *in vitro*. Toutefois les modèles cellulaires peuvent être biaisés. En effet, la différence d'activité observée entre RALDH1 et 3 pourrait être due à des facteurs extérieurs, par exemple le contexte cellulaire plutôt qu'aux propriétés catalytiques intrinsèques de ces deux enzymes. Il existe peu de données à propos des partenaires d'interaction de ces protéines dans les cellules. Leurs activités pourraient par exemple être régulées négativement ou positivement par des partenaires ou par des modifications post traductionnelles. Ce champ de recherche est demeuré relativement vierge jusqu'ici.

### 2.3.3 Interprétations des résultats expérimentaux: limitations

Les rétinoïdes, on l'a vu, ont une nature lipidique, ils sont donc peu solubles dans les milieux aqueux, c'est la raison pour laquelle il existe des protéines de transport de ces composés dans les cellules. Le substrat des RALDH, le rétinol, se lie avec une affinité élevée à CRBPI ou CRBPII [161]. Cela indique ainsi qu'il ne diffuse probablement pas librement dans le cytosol, d'autant que les aldéhydes, comme nous l'avons vu, sont très dommageables à plusieurs fonctions cellulaires. Il est donc probable que le substrat des RALDH soit le rétinol associé à une protéine de transport. On sait d'ailleurs que RALDH1 reconnaît le rétinol comme substrat *in vitro* lorsqu'il est lié à la protéine de transport CRBPI [193].

Dans le but de compenser l'absence de protéines de transport des rétinoïdes dans le milieu réactionnel, les activités de RALDH1, 2 et 3 ont été mesurées en présence d'une faible concentration de détergent qui favorise la solubilité du rétinol dans le milieu réactionnel [210, 216, 230, 474]). Cela pourrait avoir un effet néfaste sur les enzymes ou sur la reconnaissance du substrat, surtout si l'on se souvient que les détergents sont des molécules qui possèdent une partie aliphatique qui pourrait entrer en compétition avec la chaîne poly-isoprènes du rétinol dans le site actif. D'ailleurs, l'activité de RALDH4 a été mesurée en l'absence de détergent. En effet,

selon des résultats que nous ne présentons pas ici, l'ajout de détergent bloque totalement l'activité de RALDH4 *in vitro* (tandis qu'au contraire l'absence de détergent nuit fortement à l'activité de RALDH3).

Enfin, les activités de RALDH1 et 2 furent mesurées à un pH de 7.4, proche du pH du milieu intracellulaire [216, 231]. Cependant, d'après nos données, l'activité de RALDH3 était très faible à ce pH, raison pour laquelle nous avons choisi de caractériser cette enzyme à un pH de 8.5. Cette forte influence du pH sur l'activité de RALDH3 a d'ailleurs été confirmée par d'autres auteurs [210].

Pour les raisons que nous venons d'évoquer, la caractérisation des différentes RALDH n'a pas été conduite dans des conditions réactionnelles toujours identiques. Il est difficile de déterminer les conditions *in vitro* que nous devrions utiliser pour nous approcher des vraies conditions physiologiques. En effet, comme nous l'avons dit, il est raisonnable de penser que le substrat des RALDH soit le rétinol associé à une protéine de transport comme CRBPI et II. La liaison de ces protéines avec l'une ou l'autre des RALDH crée possiblement un microenvironnement auquel il est malaisé d'accéder expérimentalement, à moins d'ajouter ces protéines de transport purifiées au milieu réactionnel.

### **3. Les RALDH en tant que marqueurs pronostiques dans le cancer du sein**

#### **3.1 RALDH1, marqueur de cellules souches cancéreuses et de mauvais pronostique**

Nous avons vu que RALDH1 semblait beaucoup moins efficace que RALDH3 dans la synthèse l'AR *in vitro* ou lorsque exprimée dans des cellules mammaires. Il a été proposé que RALDH1 serait un marqueur de cellules souches chez l'homme mais aussi un marqueur de tumeurs plus agressives et de mauvais pronostique dans le cancer du sein [214, 480, 481]. En particulier RALDH1 serait un marqueur d'une

plus grande probabilité de développer des métastases [482]. L'analyse des profils d'expression des cellules de la hiérarchie de l'épithélium mammaire suggère qu'il n'y aurait pas d'expression différentielle de RALDH1 entre les cellules souches et les autres types de cellules de la glande mammaire, notamment les cellules du compartiment luminal [310, 483, 484]. D'ailleurs C. Ginestier et ses collègues, qui ont utilisé le kit aldefluor® pour trier les cellules souches mammaires, ne voient qu'une faible proportion de ces cellules qui expriment RALDH1, la plupart ne l'expriment pas [214]. Si l'on ajoute que RALDH1 est indétectable dans la glande mammaire de souris, cela indique que le fait que RALDH1 soit un marqueur de cellules souches mammaires est encore une question en suspend. Pourtant d'autres auteurs ont montré que l'expression de HER2 dans les cellules mammaires induit l'acquisition d'un phénotype similaire à celui des cellules souches ainsi que l'augmentation de la proportion de cellules aldefluor®-positives [485]. Or nous montrons, en accord avec d'autres auteurs [481], que RALDH1 semble effectivement être plus exprimée dans les tumeurs de type HER2-positif, mais nos résultats montrent que RALDH3 est aussi plus fortement exprimée dans ces tumeurs. En outre nous savons maintenant que le kit aldefluor® n'est pas sélectif pour RALDH1. L'activité détectée dans les cellules aldefluor®-positives pourrait donc aussi être attribuable à RALDH3. La question de savoir si RALDH1 est un marqueur de cellules souches mammaires est donc, semble-t-il, encore sans réponse vraiment claire.

Son rôle est en tout cas obscur dans les cellules qui l'expriment. Nous ne savons pas si sa plus faible activité la différencie vraiment de RALDH3, car la concentration effective de rétinol dans le micro-environnement des cellules qui expriment respectivement ces deux enzymes ainsi que leurs niveaux d'expression relatifs ne sont pas connus. Or ces paramètres peuvent fortement influencer le niveau de synthèse d'AR. RALDH1 pourrait aussi être impliquée dans d'autres voies métaboliques car il est connu qu'elle reconnaît un grand nombre de substrats. Il a d'ailleurs été suggéré qu'elle serait impliquée dans la résistance aux traitements en raison de sa capacité à participer au métabolisme de certains médicaments comme la

cyclophosphamide [486, 487]. Enfin, il a été montré que l'AR pouvait réguler l'autorenouvellement et la différenciation *in vitro* des cellules souches mammaires cancéreuses [488]. Dans cette étude, les auteurs montrent que les cellules mammaires 184B5 aldefluor®-positives forment un plus grand nombre de mammosphères (une capacité qu'ont les cellules souches lorsque cultivées en suspension) que les cellules 184A1 aldefluor®-négatives. Le traitement par l'AR diminue le nombre de mammosphères tandis-que le traitement par DEAB l'augmente. Cela suggère que l'AR induit une différenciation des cellules souches que le DEAB réprime, probablement par l'inhibition de l'activité ALDH. Or nous pensons, comme nous le discutons en détail plus loin, que le kit aldefluor® n'est pas sélectif de RALDH1 et que le DEAB inhibe RALDH1 et 3. Il serait intéressant de déterminer quelles RALDH sont exprimées dans les cellules formant des mammosphères.

Toutefois on ne sait pas si l'AR joue un rôle dans le contrôle de la différenciation des cellules souches mammaires *in vivo*. En outre, si c'est le cas, il peut être produit soit dans la niche de la cellule souche (par les cellules environnantes, sous l'effet d'un stimuli quelconque) aussi bien que par la cellule souche elle-même. Une façon de répondre à ces questions serait de supprimer génétiquement l'expression de RALDH1 et/ou de 3 dans les cellules épithéliales de la glande mammaire chez la souris. Cependant, si le schéma d'expression de RALDH3 semble similaire dans la glande mammaire chez l'homme et la souris, ce n'est semble-t-il pas le cas pour RALDH1, ce qui pourrait limiter l'utilisation de ce genre de modèles. D'ailleurs chez la souris, la suppression de RALDH1 n'a pas d'effets répertoriés sur la glande mammaire [229].

### 3.2 RALDH3, marqueur de différenciation luminale et de bon pronostique?

Nous avons analysé les données de trois études indépendantes regroupant les profils d'expression d'importants groupes de tumeurs en fonction de l'expression de RALDH3 dans la tumeur elle-même. Les données sur le devenir des patientes étant connues, notamment la formation de métastases distantes, nous pouvons constater

que dans tous les cas, les patientes qui ont un plus haut niveau d'expression de RALDH3 dans la tumeur présentent une probabilité moindre d'avoir des métastases (article 2, figure 9). Mais cela n'est vrai que pour les tumeurs lumineales ER $\alpha$ -positives. RALDH3 n'est pas un bon prédicteur de la formation de métastases distantes chez les patientes de tumeurs ER $\alpha$ -négatives. En outre, l'analyse des profils d'expression des cellules de la hiérarchie de l'épithélium mammaire suggère que RALDH3 serait un marqueur du lignage luminal, des progéniteurs jusqu'aux cellules lumineales en différenciation [310, 483, 484] tandis que les cellules souches mammaires l'expriment faiblement. On peut imaginer que la capacité de RALDH3 à synthétiser de plus fortes quantités d'AR, qui est connu pour induire la différenciation des cellules mammaires, est importante pour sa fonction dans les cellules épithéliales. RALDH3 pourrait aussi, en accord avec nos résultats, protéger les cellules mammaires contre la transformation. Il serait intéressant d'étudier les effets de la suppression ou de la surexpression de protéines connues pour induire une différenciation de type lumineale sur l'expression de RALDH3, comme GATA-3 [318]. GATA-3 induit l'expression de ER $\alpha$  dans les cellules lumineales [318]. Pourtant, des données d'IHC, que nous ne présentons pas ici, suggèrent que dans le tissu mammaire humain normal, les expressions de RALDH3 et de ER $\alpha$  sont mutuellement exclusives dans la couche lumineale. Il se pourrait que les cellules qui expriment RALDH3 et ER $\alpha$  soient deux sous populations distinctes de cellules lumineales différenciées.

### 3.3 Comment discriminer les cellules qui expriment RALDH1 ou RALDH3?

#### 3.3.1 Le kit aldefluor® n'est pas sélectif

Une méthode a été développée, nous l'avons évoqué, afin d'isoler les cellules souches sur la base de leur forte activité ALDH. Elle est mise en œuvre dans le kit commercial aldefluor®. La sélectivité de ce kit pour les différentes RALDH n'était cependant pas rapportée. La plupart des auteurs attribuent l'activité aldefluor® à

RALDH1, sans preuves réellement convaincantes. Pour le vérifier nous avons procédé à des expériences de transfection transitoire dans des cellules Hela exprimant transitoirement les orthologues humain de RALDH1 ou bien de RALDH3. Nous avons pu constater que le kit ne semble pas être en mesure de discriminer entre les cellules qui expriment RALDH1 et celles qui expriment RALDH3 (figure 4). La suppression de l'expression de RALDH3 par un ARN interférent diminue aussi l'activité aldefluor® de cette lignée. Comme RALDH1 et 3 sont exprimées dans la glande mammaire, le kit pourrait manquer de sélectivité. De plus, il semble que l'inhibiteur de l'activité ALDH utilisé dans ce kit, le DEAB, ait la propriété d'inhiber RALDH1 et 3, aussi bien dans les cellules transfectées (article 3) qu'*in vitro* lors de tests enzymatiques avec les orthologues murins, humains ou de rat de RALDH1 et 3. Bien que RALDH1 soit inhibée par de plus faibles doses de DEAB que RALDH3, cela pourrait tout de même interférer avec la sélectivité du kit. Cette méthode conduit donc probablement en la purification de populations cellulaires hétérogènes.

### 3.3.2 Concevoir une méthode pour discriminer les cellules qui expriment RALDH1 et RALDH3?

L'étude *in vitro* des caractéristiques cinétiques de RALDH1 et 3 que nous avons entamée pourrait nous aider mettre au point une méthode similaire à aldefluor® mais plus sélective pour chacune des RALDH. Nos résultats indiquent en effet que ces enzymes ont des caractéristiques catalytiques et de reconnaissance du substrat différentes. Nous pourrions tirer avantage de ces différences afin de développer des substrats fluorescents ou des inhibiteurs sélectifs de chacune de ces enzymes afin d'être en mesure de mettre en œuvre une méthode similaire à aldefluor® pour les cellules de la glande mammaire. Par exemple, nous savons que RALDH1 reconnaît le rétinol 9-*cis*, mais pas RALDH3. Un composé dont la structure mimerait celle du rétinol 9-*cis* pourrait s'avérer prometteur. Des études de modélisation *in silico* de ces deux enzymes ont été initiées afin de concevoir ce genre de composés, que nous testerons sur notre modèle cellulaire Hela exprimant RALDH1 ou 3. Nous avons aussi vu que RALDH1 était inhibée par la  $\beta$ -ionone, mais RALDH3 beaucoup moins.

Cela ouvre la possibilité de développer des composés permettant d'inhiber spécifiquement l'activité aldefluor® due à RALDH1 ou à RALDH3 dans les cellules. Nous avons adapté la méthode expérimentale que nous utilisons pour caractériser enzymatiquement RALDH1 et 3 *in vitro*, afin de réaliser le criblage d'une banque de composés susceptibles d'inhiber l'activité de RALDH1 spécifiquement. Nous avons déjà obtenu des résultats positifs pour certains de ces composés, dont plusieurs semblent ne pas inhiber l'activité de RALDH3. Inhibiteur et substrats sélectifs, pourraient nous aider à isoler les populations de cellules mammaires vivantes en fonction de l'expression des RALDH, ce qui permettrait leur caractérisation par diverses méthodes (biologie cellulaire, analyse de profils d'expression). Cet outil serait précieux pour comprendre le rôle de ces enzymes dans la glande mammaire.



## Conclusion

Nous démontrons ici, à notre connaissance pour la première fois, que la signalisation de l'AR est activée dans les cellules de la couche luminale de la glande mammaire de souris. Nous proposons que l'AR y est synthétisé par RALDH3 (et peut être par d'autres enzymes).

Nos résultats indiquent que RALDH1 et 3 pourraient avoir des rôles distincts dans la glande mammaire. Nous proposons que RALDH3 pourrait être impliquée dans la différenciation des cellules de la lignée luminale, via la synthèse d'AR tandis que RALDH1 pourrait être aussi impliquée dans la synthèse d'AR, mais dans les cellules souches. Nous pouvons proposer un schéma hypothétique des niveaux de la hiérarchie mammaire où ces deux enzymes pourraient intervenir (figure 1).

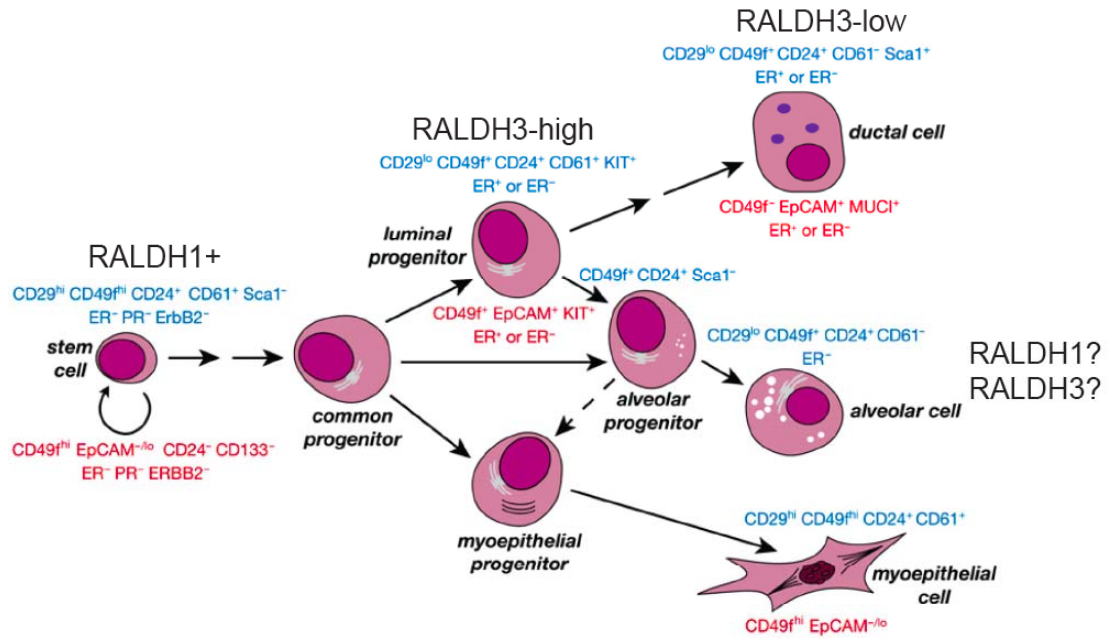
La méthode aldéfluor® utilise une approche intéressante, mais nous pensons qu'elle pourrait être améliorée. Les résultats de notre étude pourraient permettre le développement rationnel d'outils de détection spécifique de RALDH1 et 3 dans les populations de cellules mammaires normales ou cancéreuses. Cela serait très utile pour mieux décrypter le rôle de ces enzymes et de la synthèse de l'AR, aussi bien dans la glande mammaire que dans les divers tissus épithéliaux de l'organisme. Cela est susceptible de contribuer à l'amélioration des traitements contre le cancer du sein.

Nos résultats montrent aussi que RALDH3 serait impliquée dans la protection contre la transformation des cellules mammaires. L'étude de l'action de l'AR abordé du point de vue de son métabolisme en plus de la signalisation pourrait permettre une meilleure compréhension de la dynamique du contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules mammaires. Il sera toutefois important d'analyser l'effet de l'expression de RALDH1 et de RALDH3 dans un modèle plus physiologique. Les expériences *in vitro* que nous avons conduites ont l'avantage de permettre une mesure

de paramètres comme le cycle cellulaire ou d'analyser le phénotype obtenu au niveau moléculaire (western-blot, q-PCR etc..) ce qui nous met sur la piste des mécanismes mis en jeu. Pourtant ces expériences ont une portée limitée. En effet, notre étude a été faite dans un milieu de culture qui ne reproduit pas du tout le microenvironnement de la tumeur dans la glande mammaire, par exemple les interactions complexes entre la tumeur et le stroma ainsi que l'influence des niveaux d'hormones qui varient en fonction du stade du cycle menstruel. En outre, le test le plus utilisé pour quantifier *in vivo* la tumorigénicité d'une lignée mammaire cancéreuse est la xénogreffe dans le coussinet adipeux de souris nue, comme nous l'avons explicité lors de l'introduction de cette thèse [300]. Nous proposons donc de compléter cette étude avec l'injection chez la souris de cellules MCF-7 exprimant de façon stable RALDH3 ou RALDH1 ou les mutants inactifs correspondants. Ces expériences pourront nous permettre de confirmer et d'identifier potentiellement l'effet antitumoral de RALDH3 et/ou RALDH1 dans la glande mammaire et de s'affranchir des défauts évidemment inhérents d'une étude *in vitro*.

Nous avons en outre d'ores et déjà commencé la génération de modèles de souris transgéniques dépourvus de RALDH3. Nous avons vu dans l'introduction de cette thèse que la délétion génétique du gène de RALDH3 (et aussi de RALDH2) chez la souris est létale très tôt dans la vie de l'animal [248]. Une étude de la glande mammaire *in vivo* grâce à ces modèles n'est donc pas envisageable. Or il existe depuis quelques années la possibilité de créer une délétion ciblée d'un gène donné grâce à l'expression tissu-spécifique de la recombinaison CRE combinée à la modification du gène à supprimer par ajout de sites cibles de cette recombinaison (appelés sites LoXP) [489]. Nous pouvons générer chez la souris un mutant où le gène de RALDH3 est supprimé uniquement dans l'épithélium mammaire en exprimant la CRE sous la direction du promoteur MMTV (*mouse mammary tumor virus*) [490]. Nous pourrions de cette façon supprimer le gène RALDH3 de la glande mammaire, mais aussi créer des combinaisons de délétions de plusieurs RALDH. Cette technique nous permettra de déterminer l'importance du rôle de chacune des RALDH dans le développement de la glande mammaire mais aussi leurs rôles

potentiels dans la tumorigenèse mammaire. Ces modèles de souris pourront être croisés avec le modèle de souris RAREhspLacZ utilisé dans l'article 2 afin de suivre la synthèse de l'AR dans la glande mammaire en fonction des RALDH qui y sont absentes. Ces techniques *in vivo* nous permettront, en complément des études *in vitro*, de décrypter le rôle de l'AR dans la glande mammaire.



**Figure 1**

Répartition possible de l'expression de RALDH1 et 3 dans les cellules de la hiérarchie mammaire. Adapté de [264].

## Bibliographie

1. Hopkins, F.G., *Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries*. J Physiol, 1912. 44(5-6): p. 425-60.
2. McCollum E.V, D.M., *The necessity of certain lipins in the diet during growth*. J Biol Chem, 1913. 15: p. 167-175.
3. P. Karrer, R.M., K. Schöpp, *Zur Kenntnis des Vitamins-A aus Fischtranen*. Helvetica Chimica Acta, 1931. 14(5).
4. Bulley, E.C., *Note on Xerophthalmia in Rats*. Biochem J, 1919. 13(2): p. 103-6.
5. Emmett, A.D., *The Fat-Soluble a Vitamine and Xerophthalmia*. Science, 1920. 52(1337): p. 157-158.
6. Wald, G., *Vitamin a in Eye Tissues*. J Gen Physiol, 1935. 18(6): p. 905-915.
7. Wilson, J.G., C.B. Roth, and J. Warkany, *An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation*. Am J Anat, 1953. 92(2): p. 189-217.
8. Kochhar, D.M., *Teratogenic activity of retinoic acid*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1967. 70(3): p. 398-404.
9. Nolen, G.A., *Variations in teratogenic response to hypervitaminosis A in three strains of the albino rat*. Food Cosmet Toxicol, 1969. 7(3): p. 209-14.
10. Anzano, M.A., J.A. Olson, and A.J. Lamb, *Morphologic alterations in the trachea and the salivary gland following the induction of rapid synchronous vitamin A deficiency in rats*. Am J Pathol, 1980. 98(3): p. 717-32.
11. Sobhon, P., et al., *Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. II. Ultrastructural study of the seminiferous tubules*. Acta Anat (Basel), 1979. 103(2): p. 169-83.
12. Bern, H.A., M. Alfert, and S.M. Blair, *Cytochemical studies of keratin formation and of epithelial metaplasia in the rodent vagina and prostate*. J Histochem Cytochem, 1957. 5(2): p. 105-19.

13. Chew, B.P., C.S. Zamora, and L.O. Luedecke, *Effect of vitamin A deficiency on mammary gland development and susceptibility to mastitis through intramammary infusion with Staphylococcus aureus in mice*. Am J Vet Res, 1985. 46(1): p. 287-93.
14. Wilson, J.G. and J. Warkany, *Epithelial keratinization as evidence of fetal vitamin A deficiency*. Proc Soc Exp Biol Med, 1947. 64(4): p. 419-22.
15. Goldblatt, H. and M. Benischek, *Vitamin a Deficiency and Metaplasia*. J Exp Med, 1927. 46(5): p. 699-707.
16. Wolbach, S.B. and P.R. Howe, *Epithelial Repair in Recovery from Vitamin a Deficiency : An Experimental Study*. J Exp Med, 1933. 57(3): p. 511-526.
17. Sporn, M.B., et al., *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)*. Fed Proc, 1976. 35(6): p. 1332-8.
18. Olson, J.A., *The biosynthesis and metabolism of carotenoids and retinol (vitamin A)*. J Lipid Res, 1964. 5(3): p. 281-99.
19. Bendich, A. and J.A. Olson, *Biological actions of carotenoids*. FASEB J, 1989. 3(8): p. 1927-32.
20. Handelman, G.J., *The evolving role of carotenoids in human biochemistry*. Nutrition, 2001. 17(10): p. 818-22.
21. von Lintig, J., et al., *Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals*. Biochim Biophys Acta, 2005. 1740(2): p. 122-31.
22. Tanumihardjo, S.A., *Factors influencing the conversion of carotenoids to retinol: bioavailability to bioconversion to bioefficacy*. Int J Vitam Nutr Res, 2002. 72(1): p. 40-5.
23. Harrison, E.H., *Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A*. Annu Rev Nutr, 2005. 25: p. 87-103.
24. Harrison, E.H. and M.M. Hussain, *Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A*. J Nutr, 2001. 131(5): p. 1405-8.
25. Blomhoff, R., M.H. Green, and K.R. Norum, *Vitamin A: physiological and biochemical processing*. Annu Rev Nutr, 1992. 12: p. 37-57.
26. Ganguly, J., *Absorption of vitamin A*. Am J Clin Nutr, 1969. 22(7): p. 923-33.
27. Napoli, J.L., *Quantification of physiological levels of retinoic acid*. Methods Enzymol, 1986. 123: p. 112-24.

28. Napoli, J.L., et al., *Quantification of retinoic acid by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: total versus all-trans-retinoic acid in human plasma*. J Lipid Res, 1985. 26(3): p. 387-92.
29. Arens, J.F. and D.A. Van Dorp, *Synthesis of some Compounds Possessing Vitamin A Activity*. Nature, 1946. 157: p. 190-191.
30. Dowling, J.E. and G. Wald, *The Biological Function of Vitamin a Acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. 46(5): p. 587-608.
31. Emerick, R.J., M. Zile, and H.F. DeLuca, *Formation of retinoic acid from retinol in the rat*. Biochem J, 1967. 102(2): p. 606-11.
32. Deshmukh, D.S., P. Malathi, and J. Ganguly, *Rapid conversion of retinal (vitamin A aldehyde) to retinoic acid (vitamin A acid) in the living rat*. Biochim Biophys Acta, 1965. 107(1): p. 120-2.
33. Mahadevan, S., S.K. Murthy, and J. Ganguly, *Enzymic oxidation of vitamin A aldehyde to vitamin A acid by rat liver*. Biochem J, 1962. 85(2): p. 326-31.
34. Chabre, M. and P. Deterre, *Molecular mechanism of visual transduction*. Eur J Biochem, 1989. 179(2): p. 255-66.
35. Blalock, J.E. and G.E. Gifford, *Retinoic acid (vitamin A acid) induced transcriptional control of interferon production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5382-6.
36. Kurkinen, M., et al., *Isolation of cDNA clones for basal lamina components: type IV procollagen*. Nucleic Acids Res, 1983. 11(18): p. 6199-209.
37. Williams, J.B. and J.L. Napoli, *Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(14): p. 4658-62.
38. Hamilton, T.H., *Isotopic studies on estrogen-induced accelerations of ribonucleic acid and protein synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963. 49: p. 373-9.
39. Hamilton, T.H., *Sequences of Rna and Protein Synthesis during Early Estrogen Action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. 51: p. 83-9.
40. Billing, R.J., B. Barbiroli, and R.M. Smellie, *The influence of oestradiol-17beta on ribonucleic acid synthesis in rat uterus*. Biochem J, 1968. 110(3): p. 30P-31P.

41. Jensen, E.V. and H.I. Jacobsen, *Basic guides to the mechanism of estrogen action*. Recent Prog Horm Res, 1962(18): p. 387-414.
42. Hollenberg, S.M., et al., *Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA*. Nature, 1985. 318(6047): p. 635-41.
43. Weinberger, C., et al., *Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection*. Science, 1985. 228(4700): p. 740-2.
44. Walter, P., et al., *Cloning of the human estrogen receptor cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(23): p. 7889-93.
45. Green, S., et al., *Cloning of the human oestrogen receptor cDNA*. J Steroid Biochem, 1986. 24(1): p. 77-83.
46. Koike, S., M. Sakai, and M. Muramatsu, *Molecular cloning and characterization of rat estrogen receptor cDNA*. Nucleic Acids Res, 1987. 15(6): p. 2499-513.
47. Jeltsch, J.M., et al., *Cloning of the chicken progesterone receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(15): p. 5424-8.
48. Conneely, O.M., et al., *Molecular cloning of the chicken progesterone receptor*. Science, 1986. 233(4765): p. 767-70.
49. Loosfelt, H., et al., *Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. 83(23): p. 9045-9.
50. McDonnell, D.P., et al., *Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D*. Science, 1987. 235(4793): p. 1214-7.
51. Baker, A.R., et al., *Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(10): p. 3294-8.
52. Brooks, S.C., E.R. Locke, and H.D. Soule, *Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma*. J Biol Chem, 1973. 248(17): p. 6251-3.
53. Green, S. and P. Chambon, *A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors*. Nature, 1986. 324(6098): p. 615-7.
54. Chytil, F., *Retinoic acid: biochemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutic use*. Pharmacol Rev, 1984. 36(2 Suppl): p. 93S-100S.



55. Shubeita, H.E., J.F. Sambrook, and A.M. McCormick, *Molecular cloning and analysis of functional cDNA and genomic clones encoding bovine cellular retinoic acid-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(16): p. 5645-9.
56. Omori, M., Y. Muto, and T. Nagao, *Cellular retinoid-binding proteins in regenerating rat liver: demonstration of a novel cellular retinoid-binding protein*. J Lipid Res, 1981. 22(6): p. 899-904.
57. Sani, B.P. and D.L. Hill, *A retinoic acid-binding protein from chick embryo skin*. Cancer Res, 1976. 36(2 Pt 1): p. 409-13.
58. Sani, B.P. and D.L. Hill, *Retinoic acid: a binding protein in chick embryo metatarsal skin*. Biochem Biophys Res Commun, 1974. 61(4): p. 1276-82.
59. Mehta, R.G., W.L. Cerny, and R.C. Moon, *Nuclear interactions of retinoic acid-binding protein in chemically induced mammary adenocarcinoma*. Biochem J, 1982. 208(3): p. 731-6.
60. Cope, F.O., K.L. Knox, and R.C. Hall, Jr., *Rat testes interstitial cell nuclei exhibit three distinct receptors for retinoic acid*. Experientia, 1984. 40(3): p. 276-7.
61. Petkovich, M., et al., *A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors*. Nature, 1987. 330(6147): p. 444-50.
62. Giguere, V., et al., *Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid*. Nature, 1987. 330(6149): p. 624-9.
63. Brand, N., et al., *Identification of a second human retinoic acid receptor*. Nature, 1988. 332(6167): p. 850-3.
64. Krust, A., et al., *A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(14): p. 5310-4.
65. Vasios, G.W., et al., *A retinoic acid-responsive element is present in the 5' flanking region of the laminin B1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(23): p. 9099-103.
66. Smith, W.C., et al., *A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter*. EMBO J, 1991. 10(8): p. 2223-30.

67. Glass, C.K., O.V. DeVary, and M.G. Rosenfeld, *Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the alpha retinoic acid receptor*. Cell, 1990. 63(4): p. 729-38.
68. Zhang, X.K., et al., *Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors*. Nature, 1992. 355(6359): p. 441-6.
69. Leid, M., et al., *Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently*. Cell, 1992. 68(2): p. 377-95.
70. Zhang, X.K., et al., *Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid*. Nature, 1992. 358(6387): p. 587-91.
71. Heery, D.M., et al., *Efficient transactivation by retinoic acid receptors in yeast requires retinoid X receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(9): p. 4281-5.
72. Yu, V.C., et al., *RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements*. Cell, 1991. 67(6): p. 1251-66.
73. Levin, A.A., et al., *9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha*. Nature, 1992. 355(6358): p. 359-61.
74. Heyman, R.A., et al., *9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor*. Cell, 1992. 68(2): p. 397-406.
75. Nagpal, S., et al., *RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo*. EMBO J, 1993. 12(6): p. 2349-60.
76. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. 83(6): p. 835-9.
77. Katahira, M., et al., *The structure of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain determined by NMR*. Nucleic Acids Symp Ser, 1992(27): p. 65-6.
78. Lee, M.S., et al., *NMR assignments and secondary structure of the retinoid X receptor alpha DNA-binding domain. Evidence for the novel C-terminal helix*. Eur J Biochem, 1994. 224(2): p. 639-50.

79. Lee, M.S., et al., *Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding*. Science, 1993. 260(5111): p. 1117-21.
80. Renaud, J.P., et al., *Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid*. Nature, 1995. 378(6558): p. 681-9.
81. Bourguet, W., et al., *Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor*. Protein Expr Purif, 1995. 6(5): p. 604-8.
82. Bastien, J. and C. Rochette-Egly, *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes*. Gene, 2004. 328: p. 1-16.
83. Mark, M., et al., *A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse*. Proc Nutr Soc, 1999. 58(3): p. 609-13.
84. Kastner, P., et al., *Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development*. Development, 1997. 124(2): p. 313-26.
85. Rochette-Egly, C. and P. Germain, *Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs)*. Nucl Recept Signal, 2009. 7: p. e005.
86. Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*. FASEB J, 1996. 10(9): p. 940-54.
87. Mangelsdorf, D.J. and R.M. Evans, *The RXR heterodimers and orphan receptors*. Cell, 1995. 83(6): p. 841-50.
88. Leid, M., P. Kastner, and P. Chambon, *Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways*. Trends Biochem Sci, 1992. 17(10): p. 427-33.
89. Rastinejad, F., *Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family*. Curr Opin Struct Biol, 2001. 11(1): p. 33-8.
90. Khorasanizadeh, S. and F. Rastinejad, *Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(6): p. 384-90.
91. Rastinejad, F., et al., *Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DRI*. EMBO J, 2000. 19(5): p. 1045-54.

92. Zhao, Q., et al., *Structural basis of RXR-DNA interactions*. J Mol Biol, 2000. 296(2): p. 509-20.
93. Rastinejad, F., C. Evilia, and P. Lu, *Studies of nucleic acids and their protein interactions by 19F NMR*. Methods Enzymol, 1995. 261: p. 560-75.
94. Han, K., I. Moon, and H.J. Lim, *All-trans- and 9-cis-retinoic acids activate the human cyclooxygenase-2 gene: a role for DR1 as RARE or RXRE*. Mol Biol Rep, 2010.
95. Castelein, H., et al., *Sequence requirements for high affinity retinoid X receptor-alpha homodimer binding*. Mol Cell Endocrinol, 1996. 119(1): p. 11-20.
96. Byers, S., et al., *Retinoids increase cell-cell adhesion strength, beta-catenin protein stability, and localization to the cell membrane in a breast cancer cell line: a role for serine kinase activity*. Endocrinology, 1996. 137(8): p. 3265-73.
97. Dalman, F.C., et al., *Retinoic acid receptor belongs to a subclass of nuclear receptors that do not form "docking" complexes with hsp90*. Biochemistry, 1991. 30(22): p. 5605-8.
98. Depoix, C., et al., *Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists*. J Biol Chem, 2001. 276(12): p. 9452-9.
99. Hua, S., R. Kittler, and K.P. White, *Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer*. Cell, 2009. 137(7): p. 1259-71.
100. Lupien, M., et al., *FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription*. Cell, 2008. 132(6): p. 958-70.
101. Glass, C.K. and M.G. Rosenfeld, *The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors*. Genes Dev, 2000. 14(2): p. 121-41.
102. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. Physiol Rev, 2001. 81(3): p. 1269-304.
103. Blumberg, B., et al., *An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning*. Development, 1997. 124(2): p. 373-9.
104. Tang, X.H. and L.J. Gudas, *Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer*. Annu Rev Pathol, 2010.

105. Guenther, M.G., et al., *A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness*. *Genes Dev*, 2000. 14(9): p. 1048-57.
106. Muscat, G.E., L.J. Burke, and M. Downes, *The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70*. *Nucleic Acids Res*, 1998. 26(12): p. 2899-907.
107. Weston, A.D., B. Blumberg, and T.M. Underhill, *Active repression by unliganded retinoid receptors in development: less is sometimes more*. *J Cell Biol*, 2003. 161(2): p. 223-8.
108. Wei, L.N., *Retinoids and receptor interacting protein 140 (RIP140) in gene regulation*. *Curr Med Chem*, 2004. 11(12): p. 1527-32.
109. Hu, X., et al., *Suppressive effect of receptor-interacting protein 140 on coregulator binding to retinoic acid receptor complexes, histone-modifying enzyme activity, and gene activation*. *J Biol Chem*, 2004. 279(1): p. 319-25.
110. White, J.H., et al., *Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors*. *Vitam Horm*, 2004. 68: p. 123-43.
111. Fernandes, I., et al., *Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms*. *Mol Cell*, 2003. 11(1): p. 139-50.
112. Ringrose, L. and R. Paro, *Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins*. *Annu Rev Genet*, 2004. 38: p. 413-43.
113. Lund, A.H. and M. van Lohuizen, *Polycomb complexes and silencing mechanisms*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. 16(3): p. 239-46.
114. Gillespie, R.F. and L.J. Gudas, *Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells*. *J Mol Biol*, 2007. 372(2): p. 298-316.
115. Kashyap, V. and L.J. Gudas, *Epigenetic regulatory mechanisms distinguish retinoic acid-mediated transcriptional responses in stem cells and fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2010. 285(19): p. 14534-48.

116. Wei, L.N., *Retinoid receptors and their coregulators*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43: p. 47-72.
117. Chen, S.L., et al., *The coactivator-associated arginine methyltransferase is necessary for muscle differentiation: CARM1 coactivates myocyte enhancer factor-2*. *J Biol Chem*, 2002. 277(6): p. 4324-33.
118. Chen, D., et al., *Regulation of transcription by a protein methyltransferase*. *Science*, 1999. 284(5423): p. 2174-7.
119. Kouzarides, T., *Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?* *EMBO J*, 2000. 19(6): p. 1176-9.
120. McKenna, N.J. and B.W. O'Malley, *Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators*. *Cell*, 2002. 108(4): p. 465-74.
121. Bour, G., S. Lalevee, and C. Rochette-Egly, *Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors*. *Trends Cell Biol*, 2007. 17(6): p. 302-9.
122. Ferry, C., et al., *SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3*. *J Biol Chem*, 2009. 284(12): p. 8127-35.
123. Loudig, O., et al., *Transcriptional co-operativity between distant retinoic acid response elements in regulation of Cyp26A1 inducibility*. *Biochem J*, 2005. 392(Pt 1): p. 241-8.
124. Adams, J., *The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer*. *Breast Dis*, 2002. 15: p. 61-70.
125. Perissi, V., et al., *A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors*. *Cell*, 2004. 116(4): p. 511-26.
126. Higazi, A., et al., *Promoter context determines the role of proteasome in ligand-dependent occupancy of retinoic acid responsive elements*. *Epigenetics*, 2011. 6(2).
127. Desvergne, B., *RXR: from partnership to leadership in metabolic regulations*. *Vitam Horm*, 2007. 75: p. 1-32.

128. Tanaka, T. and L.M. De Luca, *Therapeutic potential of "rexinoids" in cancer prevention and treatment*. *Cancer Res*, 2009. 69(12): p. 4945-7.
129. Matsusue, K., et al., *Ligand-activated PPARbeta efficiently represses the induction of LXR-dependent promoter activity through competition with RXR*. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. 256(1-2): p. 23-33.
130. Ide, T., et al., *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling*. *Mol Endocrinol*, 2003. 17(7): p. 1255-67.
131. Kouidhi, S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulates hypothalamic Trh regulation in vivo*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 317(1-2): p. 44-52.
132. Chan, L.S. and R.A. Wells, *Cross-Talk between PPARs and the Partners of RXR: A Molecular Perspective*. *PPAR Res*, 2009. 2009: p. 925309.
133. Allenby, G., et al., *Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(1): p. 30-4.
134. Calleja, C., et al., *Genetic and pharmacological evidence that a retinoic acid cannot be the RXR-activating ligand in mouse epidermis keratinocytes*. *Genes Dev*, 2006. 20(11): p. 1525-38.
135. Wolf, G., *Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor?* *Nutr Rev*, 2006. 64(12): p. 532-8.
136. Germain, P., et al., *Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy*. *Nature*, 2002. 415(6868): p. 187-92.
137. Gianni, M., et al., *The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers*. *J Biol Chem*, 2003. 278(36): p. 34458-66.
138. Vernet, N., et al., *Prepubertal testis development relies on retinoic acid but not rexinoid receptors in Sertoli cells*. *EMBO J*, 2006. 25(24): p. 5816-25.
139. Chambon, P., *Spatio-temporally-controlled somatic mutations in the mouse*. *Pathol Biol (Paris)*, 1998. 46(9): p. 671-3.

140. Mark, M., N.B. Ghyselinck, and P. Chambon, *Function of retinoic acid receptors during embryonic development*. Nucl Recept Signal, 2009. 7: p. e002.
141. Boylan, J.F., et al., *Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism*. Mol Cell Biol, 1995. 15(2): p. 843-51.
142. Kawaguchi, R., et al., *A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A*. Science, 2007. 315(5813): p. 820-5.
143. Rosselot, C., et al., *Non-cell-autonomous retinoid signaling is crucial for renal development*. Development, 2010. 137(2): p. 283-92.
144. Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duester, *Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning*. Development, 2006. 133(10): p. 1901-10.
145. Peterson, P.A., *Characteristics of a vitamin A-transporting protein complex occurring in human serum*. J Biol Chem, 1971. 246(1): p. 34-43.
146. Colantuoni, V., et al., *Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for human retinol-binding protein*. Nucleic Acids Res, 1983. 11(22): p. 7769-76.
147. Ghyselinck, N.B., et al., *Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein*. Dev Dyn, 2006. 235(6): p. 1608-22.
148. Ross, A.C., *Mutations in the gene encoding retinol binding protein and retinol deficiency: is there compensation by retinyl esters and retinoic acid?* Am J Clin Nutr, 1999. 69(5): p. 829-30.
149. Maiti, T.K., et al., *Binding of all-trans retinoic acid to human serum albumin: fluorescence, FT-IR and circular dichroism studies*. Int J Biol Macromol, 2006. 38(3-5): p. 197-202.
150. Blaner, W.S., *STRA6, a cell-surface receptor for retinol-binding protein: the plot thickens*. Cell Metab, 2007. 5(3): p. 164-6.
151. Bouillet, P., et al., *Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein*. Mech Dev, 1997. 63(2): p. 173-86.



152. Biesalski, H.K. and D. Nohr, *Importance of vitamin-A for lung function and development*. Mol Aspects Med, 2003. 24(6): p. 431-40.
153. Newcomer, M.E., *Retinoid-binding proteins: structural determinants important for function*. FASEB J, 1995. 9(2): p. 229-39.
154. Ong, D.E., *A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization*. J Biol Chem, 1984. 259(3): p. 1476-82.
155. MacDonald, P.N. and D.E. Ong, *Binding specificities of cellular retinol-binding protein and cellular retinol-binding protein, type II*. J Biol Chem, 1987. 262(22): p. 10550-6.
156. Inagami, S. and D.E. Ong, *Purification and partial characterization of cellular retinol-binding protein, type two, from human small intestine*. J Nutr, 1992. 122(3): p. 450-6.
157. Saari, J.C., et al., *Analysis of the visual cycle in cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) knockout mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(6): p. 1730-5.
158. Ghyselinck, N.B., et al., *Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis*. EMBO J, 1999. 18(18): p. 4903-14.
159. Matt, N., et al., *Contribution of cellular retinol-binding protein type I to retinol metabolism during mouse development*. Dev Dyn, 2005. 233(1): p. 167-76.
160. Wongsiriroj, N., et al., *The molecular basis of retinoid absorption: a genetic dissection*. J Biol Chem, 2008. 283(20): p. 13510-9.
161. Parisotto, M., et al., *[Retinoid metabolism and cancer]*. Med Sci (Paris), 2006. 22(12): p. 1101-6.
162. Pfoertner, S., et al., *Cellular retinoic acid binding protein I: expression and functional influence in renal cell carcinoma*. Tumour Biol, 2005. 26(6): p. 313-23.
163. Blaese, M.A., L. Santo-Hoeltje, and H.P. Rodemann, *CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation*. Int J Radiat Biol, 2003. 79(12): p. 981-91.
164. Tang, X.H., M. Vivero, and L.J. Gudas, *Overexpression of CRABPI in suprabasal keratinocytes enhances the proliferation of epidermal basal keratinocytes*

*in mouse skin topically treated with all-trans retinoic acid.* Exp Cell Res, 2008. 314(1): p. 38-51.

165. Napoli, J.L., et al., *Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of cellular retinol-binding protein (CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis.* Biomed Pharmacother, 1991. 45(4-5): p. 131-43.

166. Fiorella, P.D. and J.L. Napoli, *Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in Escherichia coli. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism.* J Biol Chem, 1991. 266(25): p. 16572-9.

167. Fiorella, P.D. and J.L. Napoli, *Microsomal retinoic acid metabolism. Effects of cellular retinoic acid-binding protein (type I) and C18-hydroxylation as an initial step.* J Biol Chem, 1994. 269(14): p. 10538-44.

168. Boylan, J.F. and L.J. Gudas, *The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells.* J Biol Chem, 1992. 267(30): p. 21486-91.

169. Dong, D., et al., *Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid.* J Biol Chem, 1999. 274(34): p. 23695-8.

170. Sessler, R.J. and N. Noy, *A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II.* Mol Cell, 2005. 18(3): p. 343-53.

171. Delva, L., et al., *Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex.* Mol Cell Biol, 1999. 19(10): p. 7158-67.

172. Bastie, J.N., et al., *The novel co-activator CRABP II binds to RARalpha and RXRalpha via two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'.* FEBS Lett, 2001. 507(1): p. 67-73.

173. Lampron, C., et al., *Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABP II) or in both CRABP I and CRABP II are essentially normal.* Development, 1995. 121(2): p. 539-48.

174. Yin, S.J., et al., *Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance*. Chem Biol Interact, 2003. 143-144: p. 219-27.
175. Martras, S., et al., *The specificity of alcohol dehydrogenase with cis-retinoids. Activity with 11-cis-retinol and localization in retina*. Eur J Biochem, 2004. 271(9): p. 1660-70.
176. Boleda, M.D., et al., *Physiological substrates for rat alcohol dehydrogenase classes: aldehydes of lipid peroxidation, omega-hydroxyfatty acids, and retinoids*. Arch Biochem Biophys, 1993. 307(1): p. 85-90.
177. Molotkov, A., et al., *Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(8): p. 5337-42.
178. Ang, H.L., et al., *Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression*. J Biol Chem, 1996. 271(16): p. 9526-34.
179. Yang, Z.N., et al., *Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction*. Alcohol Clin Exp Res, 1994. 18(3): p. 587-91.
180. Han, C.L., et al., *Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family--implications for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases*. Eur J Biochem, 1998. 254(1): p. 25-31.
181. Posch, K.C., et al., *Holocellular retinol binding protein as a substrate for microsomal retinal synthesis*. Biochemistry, 1991. 30(25): p. 6224-30.
182. Duester, G., F.A. Mic, and A. Molotkov, *Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid*. Chem Biol Interact, 2003. 143-144: p. 201-10.
183. Pares, X., et al., *Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2008. 65(24): p. 3936-49.

184. Duester, G., *Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid*. Eur J Biochem, 2000. 267(14): p. 4315-24.
185. Markova, N.G., et al., *Expression pattern and biochemical characteristics of a major epidermal retinol dehydrogenase*. Mol Genet Metab, 2003. 78(2): p. 119-35.
186. Soref, C.M., et al., *Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol*. J Biol Chem, 2001. 276(26): p. 24194-202.
187. Yamamoto, H., et al., *Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus*. Nat Genet, 1999. 22(2): p. 188-91.
188. Wu, B.X., et al., *Identification of RDH10, an All-trans Retinol Dehydrogenase, in Retinal Muller Cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. 45(11): p. 3857-62.
189. Wu, B.X., et al., *Cloning and characterization of a novel all-trans retinol short-chain dehydrogenase/reductase from the RPE*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. 43(11): p. 3365-72.
190. Sandell, L.L., et al., *RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development*. Genes Dev, 2007. 21(9): p. 1113-24.
191. Posch, K.C. and J.L. Napoli, *Multiple retinoid dehydrogenases in testes cytosol from alcohol dehydrogenase negative or positive deermice*. Biochem Pharmacol, 1992. 43(10): p. 2296-8.
192. Penzes, P., et al., *Cloning of a rat cDNA encoding retinal dehydrogenase isozyme type I and its expression in E. coli*. Gene, 1997. 191(2): p. 167-72.
193. Posch, K.C., R.D. Burns, and J.L. Napoli, *Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal. Recognition of retinal bound to cellular retinol binding protein (type I) as substrate by a purified cytosolic dehydrogenase*. J Biol Chem, 1992. 267(27): p. 19676-82.

194. Vasiliou, V., A. Pappa, and D.R. Petersen, *Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism*. Chem Biol Interact, 2000. 129(1-2): p. 1-19.
195. Vasiliou, V., et al., *Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping*. Pharmacogenetics, 1999. 9(4): p. 421-34.
196. Vasiliou, V., A. Pappa, and T. Estey, *Role of human aldehyde dehydrogenases in endobiotic and xenobiotic metabolism*. Drug Metab Rev, 2004. 36(2): p. 279-99.
197. O'Brien, P.J., A.G. Siraki, and N. Shangari, *Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health*. Crit Rev Toxicol, 2005. 35(7): p. 609-62.
198. Esterbauer, H., R.J. Schaur, and H. Zollner, *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radic Biol Med, 1991. 11(1): p. 81-128.
199. Marchitti, S.A., et al., *Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. 4(6): p. 697-720.
200. Nadkarni, D.V. and L.M. Sayre, *Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal*. Chem Res Toxicol, 1995. 8(2): p. 284-91.
201. Brooks, P.J. and J.A. Theruvathu, *DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis*. Alcohol, 2005. 35(3): p. 187-93.
202. Pappa, A., et al., *Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. 280(30): p. 27998-8006.
203. Ohsawa, I., et al., *Deficiency in a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases vulnerability to oxidative stress in PC12 cells*. J Neurochem, 2003. 84(5): p. 1110-7.
204. Murphy, T.C., et al., *Oxidation of 4-hydroxy-2-nonenal by succinic semialdehyde dehydrogenase (ALDH5A)*. J Neurochem, 2003. 86(2): p. 298-305.

205. Liu, Z.J., et al., *The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold*. Nat Struct Biol, 1997. 4(4): p. 317-26.
206. D'Ambrosio, K., et al., *The first crystal structure of a thioacylenzyme intermediate in the ALDH family: new coenzyme conformation and relevance to catalysis*. Biochemistry, 2006. 45(9): p. 2978-86.
207. Hurley, T.D., C.G. Steinmetz, and H. Weiner, *Three-dimensional structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Mechanistic implications*. Adv Exp Med Biol, 1999. 463: p. 15-25.
208. Steinmetz, C.G., et al., *Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion*. Structure, 1997. 5(5): p. 701-11.
209. Montplaisir, V., et al., *Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans- or 9-cis-retinal*. J Biol Chem, 2002. 277(20): p. 17486-92.
210. Graham, C.E., et al., *Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3*. Biochem J, 2006. 394(Pt 1): p. 67-75.
211. Labrecque, J., P.V. Bhat, and A. Lacroix, *Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid*. Biochem Cell Biol, 1993. 71(1-2): p. 85-9.
212. King, G. and R. Holmes, *Human corneal and lens aldehyde dehydrogenases. Purification and properties of human lens ALDH1 and differential expression as major soluble proteins in human lens (ALDH1) and cornea (ALDH3)*. Adv Exp Med Biol, 1997. 414: p. 19-27.
213. Zhai, Y., Z. Sperkova, and J.L. Napoli, *Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA*. J Cell Physiol, 2001. 186(2): p. 220-32.
214. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. Cell Stem Cell, 2007. 1(5): p. 555-67.
215. Bhat, P.V. and H. Samaha, *Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers*. Biochem Pharmacol, 1999. 57(2): p. 195-7.

216. Gagnon, I., G. Duester, and P.V. Bhat, *Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type I*. *Biochem Pharmacol*, 2003. 65(10): p. 1685-90.
217. Fan, X., et al., *Targeted disruption of Aldh1a1 (Raldh1) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina*. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(13): p. 4637-48.
218. Molotkov, A. and G. Duester, *Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) functions downstream of alcohol dehydrogenase Adh1 in metabolism of retinol to retinoic acid*. *J Biol Chem*, 2003. 278(38): p. 36085-90.
219. Matt, N., et al., *Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells*. *Development*, 2005. 132(21): p. 4789-800.
220. Ziouzenkova, O., et al., *Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity*. *Nat Med*, 2007. 13(6): p. 695-702.
221. Jean, E., et al., *Aldehyde dehydrogenase activity promotes survival of human muscle precursor cells*. *J Cell Mol Med*, 2009.
222. Corti, S., et al., *Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity*. *Stem Cells*, 2006. 24(4): p. 975-85.
223. Huang, E.H., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis*. *Cancer Res*, 2009. 69(8): p. 3382-9.
224. Kastan, M.B., et al., *Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells*. *Blood*, 1990. 75(10): p. 1947-50.
225. Armstrong, L., et al., *Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity*. *Stem Cells*, 2004. 22(7): p. 1142-51.
226. Russo, J., et al., *Identification of 4-(N,N-dipropylamino)benzaldehyde as a potent, reversible inhibitor of mouse and human class I aldehyde dehydrogenase*. *Biochem Pharmacol*, 1995. 50(3): p. 399-406.

227. Trombi, L., et al., *Selective culture of mesodermal progenitor cells*. Stem Cells Dev, 2009. 18(8): p. 1227-34.
228. Chute, J.P., et al., *Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(31): p. 11707-12.
229. Levi, B.P., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1a1 is dispensable for stem cell function in the mouse hematopoietic and nervous systems*. Blood, 2009. 113(8): p. 1670-80.
230. Wang, X., P. Penzes, and J.L. Napoli, *Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in Escherichia coli. Recognition of retinal as substrate*. J Biol Chem, 1996. 271(27): p. 16288-93.
231. Gagnon, I., G. Duester, and P.V. Bhat, *Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1596(1): p. 156-62.
232. Mic, F.A., et al., *Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice*. Development, 2002. 129(9): p. 2271-82.
233. Niederreither, K., et al., *Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse*. Mech Dev, 2002. 110(1-2): p. 165-71.
234. Hsu, L.C., W.C. Chang, and A. Yoshida, *Mouse type-2 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH2): genomic organization, tissue-dependent expression, chromosome assignment and comparison to other types*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1492(1): p. 289-93.
235. Siegenthaler, J.A., et al., *Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation*. Cell, 2009. 139(3): p. 597-609.
236. Touma, S.E., et al., *Retinoid metabolism and ALDH1A2 (RALDH2) expression are altered in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate model*. Biochem Pharmacol, 2009. 78(9): p. 1127-38.
237. Moss, J.B., et al., *Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart*. Dev Biol, 1998. 199(1): p. 55-71.



238. Niederreither, K., et al., *The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system*. *Development*, 2003. 130(11): p. 2525-34.
239. Cartry, J., et al., *Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate*. *Dev Biol*, 2006. 299(1): p. 35-51.
240. Mic, F.A., et al., *Raldh2 expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation*. *Dev Dyn*, 2004. 231(2): p. 270-7.
241. Desai, T.J., et al., *Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis*. *Dev Biol*, 2006. 291(1): p. 12-24.
242. Ribes, V., et al., *Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling*. *Development*, 2006. 133(2): p. 351-61.
243. Martin, M., et al., *Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice*. *Dev Biol*, 2005. 284(2): p. 399-411.
244. Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duyster, *Retinoic acid generated by Raldh2 in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development*. *Dev Dyn*, 2005. 232(4): p. 950-7.
245. Kim, H., et al., *The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2005. 65(18): p. 8118-24.
246. Hsu, L.C., et al., *Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6*. *Genomics*, 1994. 24(2): p. 333-41.
247. Grun, F., et al., *Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development*. *J Biol Chem*, 2000. 275(52): p. 41210-8.
248. Dupe, V., et al., *A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(24): p. 14036-41.

249. Xi, J. and Z. Yang, *Expression of RALDHs (ALDH1As) and CYP26s in human tissues and during the neural differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cell*. Gene Expr Patterns, 2008. 8(6): p. 438-42.
250. Rexer, B.N., W.L. Zheng, and D.E. Ong, *Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells*. Cancer Res, 2001. 61(19): p. 7065-70.
251. Mira, Y.L.R., et al., *Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells*. J Cell Physiol, 2000. 185(2): p. 302-9.
252. Lin, M. and J.L. Napoli, *cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12*. J Biol Chem, 2000. 275(51): p. 40106-12.
253. Lin, M., et al., *Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells*. J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9856-61.
254. Thatcher, J.E. and N. Isoherranen, *The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009. 5(8): p. 875-86.
255. Taimi, M., et al., *A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid*. J Biol Chem, 2004. 279(1): p. 77-85.
256. White, J.A., et al., *Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6403-8.
257. White, J.A., et al., *cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450*. J Biol Chem, 1997. 272(30): p. 18538-41.
258. White, J.A., et al., *Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase*. J Biol Chem, 1996. 271(47): p. 29922-7.
259. Duell, E.A., S. Kang, and J.J. Voorhees, *Retinoic acid isomers applied to human skin in vivo each induce a 4-hydroxylase that inactivates only trans retinoic acid*. J Invest Dermatol, 1996. 106(2): p. 316-20.

260. Abu-Abed, S., et al., *Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis*. Mech Dev, 2002. 110(1-2): p. 173-7.
261. MacLean, G., et al., *Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development*. Mech Dev, 2001. 107(1-2): p. 195-201.
262. Abu-Abed, S., et al., *The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures*. Genes Dev, 2001. 15(2): p. 226-40.
263. Woodward, T.L., J.W. Xie, and S.Z. Haslam, *The role of mammary stroma in modulating the proliferative response to ovarian hormones in the normal mammary gland*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. 3(2): p. 117-31.
264. Visvader, J.E., *Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis*. Genes Dev, 2009. 23(22): p. 2563-77.
265. Kass, L., et al., *Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. 39(11): p. 1987-94.
266. Boulanger, C.A. and G.H. Smith, *Reprogramming cell fates in the mammary microenvironment*. Cell Cycle, 2009. 8(8): p. 1127-32.
267. Neville, M.C., et al., *The mammary fat pad*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. 3(2): p. 109-16.
268. Silberstein, G.B., *Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development*. Breast Cancer Res, 2001. 3(4): p. 218-23.
269. Beck, J.C., H.L. Hosick, and B.A. Watkins, *Growth of epithelium from a preneoplastic mammary outgrowth in response to mammary adipose tissue*. In Vitro Cell Dev Biol, 1989. 25(5): p. 409-18.
270. Wiseman, B.S. and Z. Werb, *Stromal effects on mammary gland development and breast cancer*. Science, 2002. 296(5570): p. 1046-9.
271. Booth, B.W., et al., *The mammary microenvironment alters the differentiation repertoire of neural stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(39): p. 14891-6.

272. Boulanger, C.A., et al., *Interaction with the mammary microenvironment redirects spermatogenic cell fate in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(10): p. 3871-6.
273. Jiang, S., et al., *Reconstitution of mammary epithelial morphogenesis by murine embryonic stem cells undergoing hematopoietic stem cell differentiation*. PLoS One, 2010. 5(3): p. e9707.
274. Bartley, J.C., J.T. Emerman, and M.J. Bissell, *Metabolic cooperativity between epithelial cells and adipocytes of mice*. Am J Physiol, 1981. 241(5): p. C204-8.
275. Gouon-Evans, V., E.Y. Lin, and J.W. Pollard, *Requirement of macrophages and eosinophils and their cytokines/chemokines for mammary gland development*. Breast Cancer Res, 2002. 4(4): p. 155-64.
276. Gyorki, D.E., et al., *Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland*. Breast Cancer Res, 2009. 11(4): p. R62.
277. Leong, F.J., et al., *Basal lamina visualization using color image processing and pattern recognition*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2005. 13(3): p. 273-6.
278. Richert, M.M., et al., *An atlas of mouse mammary gland development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. 5(2): p. 227-41.
279. Faraldo, M.M., et al., *[Mammary gland development: Role of basal myoepithelial cells]*. J Soc Biol, 2006. 200(2): p. 193-8.
280. Sleeman, K.E., et al., *CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells*. Breast Cancer Res, 2006. 8(1): p. R7.
281. Sleeman, K.E., et al., *Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland*. J Cell Biol, 2007. 176(1): p. 19-26.
282. Gudjonsson, T., et al., *Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties*. Genes Dev, 2002. 16(6): p. 693-706.
283. Sopel, M., *The myoepithelial cell: its role in normal mammary glands and breast cancer*. Folia Morphol (Warsz), 2010. 69(1): p. 1-14.

284. Glukhova, M., et al., *Adhesion systems in normal breast and in invasive breast carcinoma*. Am J Pathol, 1995. 146(3): p. 706-16.
285. Boecker, W. and H. Buerger, *Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept*. Cell Prolif, 2003. 36 Suppl 1: p. 73-84.
286. Yalcin-Ozuyisal, O., et al., *Antagonistic roles of Notch and p63 in controlling mammary epithelial cell fates*. Cell Death Differ, 2010.
287. Asselin-Labat, M.L., et al., *Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2007. 9(2): p. 201-9.
288. Bernardo, G.M., et al., *FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis*. Development, 2010. 137(12): p. 2045-54.
289. Clarke, R.B., et al., *Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast*. Cancer Res, 1997. 57(22): p. 4987-91.
290. Gudjonsson, T., et al., *Myoepithelial cells: their origin and function in breast morphogenesis and neoplasia*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005. 10(3): p. 261-72.
291. Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till, *Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells*. Nature, 1963. 197: p. 452-4.
292. Till, J.E., et al., *Regulation of blood cell differentiation*. Fed Proc, 1975. 34(13): p. 2279-84.
293. Chao, M.P., J. Seita, and I.L. Weissman, *Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008. 73: p. 439-49.
294. Kawamoto, H. and Y. Katsura, *A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy*. Trends Immunol, 2009. 30(5): p. 193-200.
295. Villadsen, R., *In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution*. APMIS, 2005. 113(11-12): p. 903-21.

296. Stingl, J., et al., *Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells*. Nature, 2006. 439(7079): p. 993-7.
297. Cariati, M. and A.D. Purushotham, *Stem cells and breast cancer*. Histopathology, 2008. 52(1): p. 99-107.
298. Williams, J.M. and C.W. Daniel, *Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis*. Dev Biol, 1983. 97(2): p. 274-90.
299. Smith, G.H. and G. Chepko, *Mammary epithelial stem cells*. Microsc Res Tech, 2001. 52(2): p. 190-203.
300. Deome, K.B., et al., *Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice*. Cancer Res, 1959. 19(5): p. 515-20.
301. DeOme, K.B. and D. Medina, *A new approach to mammary tumorigenesis in rodents*. Cancer, 1969. 24(6): p. 1255-8.
302. Rietze, R.L., et al., *Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain*. Nature, 2001. 412(6848): p. 736-9.
303. Baumann, P., et al., *CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis*. Cancer Res, 2005. 65(23): p. 10783-93.
304. Mercurio, A.M., et al., *Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. 6(3): p. 299-309.
305. Shackleton, M., et al., *Generation of a functional mammary gland from a single stem cell*. Nature, 2006. 439(7072): p. 84-8.
306. Kordon, E.C. and G.H. Smith, *An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell*. Development, 1998. 125(10): p. 1921-30.
307. Stingl, J., et al., *Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast*. Differentiation, 1998. 63(4): p. 201-13.
308. Stingl, J., et al., *Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue*. Breast Cancer Res Treat, 2001. 67(2): p. 93-109.

309. Eirew, P., et al., *A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability*. Nat Med, 2008. 14(12): p. 1384-9.
310. Raouf, A., et al., *Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process*. Cell Stem Cell, 2008. 3(1): p. 109-18.
311. LaBarge, M.A., et al., *Human mammary progenitor cell fate decisions are products of interactions with combinatorial microenvironments*. Integr Biol (Camb), 2009. 1(1): p. 70-9.
312. Radtke, F. and H. Clevers, *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin*. Science, 2005. 307(5717): p. 1904-9.
313. Joshi, P.A., et al., *Progesterone induces adult mammary stem cell expansion*. Nature, 2010.
314. Cicalese, A., et al., *The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells*. Cell, 2009. 138(6): p. 1083-95.
315. Aparicio, S. and C.J. Eaves, *p53: a new kingpin in the stem cell arena*. Cell, 2009. 138(6): p. 1060-2.
316. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells*. Cancer Res, 2006. 66(12): p. 6063-71.
317. Bouras, T., et al., *Notch signaling regulates mammary stem cell function and luminal cell-fate commitment*. Cell Stem Cell, 2008. 3(4): p. 429-41.
318. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland*. Cell, 2006. 127(5): p. 1041-55.
319. Veltmaat, J.M., et al., *Mouse embryonic mammaryogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation*. Differentiation, 2003. 71(1): p. 1-17.
320. Mikkola, M.L. and S.E. Millar, *The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2006. 11(3-4): p. 187-203.
321. Topper, Y.J. and C.S. Freeman, *Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland*. Physiol Rev, 1980. 60(4): p. 1049-106.
322. Smith, C.L. and B.W. O'Malley, *Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators*. Endocr Rev, 2004. 25(1): p. 45-71.

323. Green, S., et al., *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. *Nature*, 1986. 320(6058): p. 134-9.
324. Redeuilh, G., et al., *Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus*. *J Biol Chem*, 1987. 262(15): p. 6969-75.
325. Radanyi, C., et al., *Chick heat-shock protein of Mr = 90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form*. *J Biol Chem*, 1989. 264(5): p. 2568-73.
326. Denis, M., A.C. Wikstrom, and J.A. Gustafsson, *The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 non-hormone-binding protein*. *J Biol Chem*, 1987. 262(24): p. 11803-6.
327. Sanchez, E.R., et al., *The 56-59-kilodalton protein identified in untransformed steroid receptor complexes is a unique protein that exists in cytosol in a complex with both the 70- and 90-kilodalton heat shock proteins*. *Biochemistry*, 1990. 29(21): p. 5145-52.
328. Tai, P.K., et al., *A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, and glucocorticoid receptors*. *Biochemistry*, 1986. 25(18): p. 5269-75.
329. Knoblauch, R. and M.J. Garabedian, *Role for Hsp90-associated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(5): p. 3748-59.
330. Ylikomi, T., et al., *Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1998. 33(6): p. 437-66.
331. Bourdeau, V., et al., *Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells*. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(1): p. 76-93.
332. Romano, A., et al., *Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. 314(1): p. 90-100.
333. Sanchez, R., et al., *Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors*. *Bioessays*, 2002. 24(3): p. 244-54.



334. Stoner, M., et al., *Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor alpha and SP proteins*. *Oncogene*, 2004. 23(5): p. 1052-63.
335. Umayahara, Y., et al., *Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer*. *J Biol Chem*, 1994. 269(23): p. 16433-42.
336. Uht, R.M., et al., *Transcriptional activities of estrogen and glucocorticoid receptors are functionally integrated at the AP-1 response element*. *Endocrinology*, 1997. 138(7): p. 2900-8.
337. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. *Mol Endocrinol*, 2005. 19(4): p. 833-42.
338. Treuter, E., et al., *A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation*. *Mol Endocrinol*, 1998. 12(6): p. 864-81.
339. Orlando, L., et al., *Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2010. 36S3: p. S67-S71.
340. Lupien, M., et al., *Raloxifene and ICI182,780 increase estrogen receptor-alpha association with a nuclear compartment via overlapping sets of hydrophobic amino acids in activation function 2 helix 12*. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(4): p. 797-816.
341. Preisler-Mashek, M.T., et al., *Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor-alpha*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. 282(4): p. E891-8.
342. Shang, Y. and M. Brown, *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs*. *Science*, 2002. 295(5564): p. 2465-8.
343. Johnson, M. and B. Everitt, *Essential reproduction*. London: Blackwell Science, 1997.
344. Mallepell, S., et al., *Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(7): p. 2196-201.

345. Laron, Z., R. Pauli, and A. Petrtzelan, *Clinical evidence on the role of estrogens in the development of the breasts*. Proc R Soc Edinburgh 1989. 95(B1): p. 13-22.
346. Russo, J., et al., *Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland*. Breast Cancer Res Treat, 1999. 53(3): p. 217-27.
347. Cheng, G., et al., *Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(11): p. 3739-46.
348. Dickson, R.B., et al., *Induction of epidermal growth factor-related polypeptides by 17 beta-estradiol in MCF-7 human breast cancer cells*. Endocrinology, 1986. 118(1): p. 138-42.
349. Huff, K.K., et al., *Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells*. Mol Endocrinol, 1988. 2(3): p. 200-8.
350. Kleinberg, D.L. and W. Ruan, *IGF-I, GH, and sex steroid effects in normal mammary gland development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2008. 13(4): p. 353-60.
351. Ning, Y., et al., *Delayed mammary gland involution in mice with mutation of the insulin-like growth factor binding protein 5 gene*. Endocrinology, 2007. 148(5): p. 2138-47.
352. Sobolewska, A., et al., *IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway*. Eur J Cell Biol, 2009. 88(2): p. 117-30.
353. Hall, J.M. and D.P. McDonnell, *The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens*. Endocrinology, 1999. 140(12): p. 5566-78.
354. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. 20(3): p. 358-417.
355. Conneely, O.M., et al., *Reproductive functions of progesterone receptors*. Recent Prog Horm Res, 2002. 57: p. 339-55.

356. Humphreys, R.C., et al., *Use of PRKO mice to study the role of progesterone in mammary gland development*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1997. 2(4): p. 343-54.
357. Kuppumbatti, Y.S., et al., *Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(6): p. 475-80.
358. Zaragoza, R., et al., *Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. 292(4): p. E1140-8.
359. Ozpolat, B., et al., *all-trans-Retinoic acid-induced expression and regulation of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) in human promyelocytic leukemia*. Am J Hematol, 2002. 70(1): p. 39-47.
360. Ariga, N., et al., *Retinoic acid receptor and retinoid X receptor in ductal carcinoma in situ and intraductal proliferative lesions of the human breast*. Jpn J Cancer Res, 2000. 91(11): p. 1169-76.
361. Sankaran, L. and Y.J. Topper, *Effect of vitamin A deprivation on maintenance of rat mammary tissue and on the potential of the epithelium for hormone-dependent milk protein synthesis*. Endocrinology, 1982. 111(4): p. 1061-7.
362. Wang, Y.A., et al., *Retinoic acid signaling is required for proper morphogenesis of mammary gland*. Dev Dyn, 2005. 234(4): p. 892-9.
363. Emerman, J.T. and D.R. Pitelka, *Maintenance and induction of morphological differentiation in dissociated mammary epithelium on floating collagen membranes*. In Vitro, 1977. 13(5): p. 316-28.
364. Emerman, J.T., S.J. Burwen, and D.R. Pitelka, *Substrate properties influencing ultrastructural differentiation of mammary epithelial cells in culture*. Tissue Cell, 1979. 11(1): p. 109-19.
365. McGrath, M., S. Palmer, and S. Nandi, *Differential response of normal rat mammary epithelial cells to mammogenic hormones and EGF*. J Cell Physiol, 1985. 125(2): p. 182-91.
366. Montesano, R., F. Carrozzino, and P. Soulie, *Low concentrations of transforming growth factor-beta-1 induce tubulogenesis in cultured mammary epithelial cells*. BMC Dev Biol, 2007. 7: p. 7.

367. Soriano, J.V., et al., *Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells*. J Cell Sci, 1995. 108 ( Pt 2): p. 413-30.
368. Aggeler, J., et al., *Cytodifferentiation of mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane reveals striking similarities to development in vivo*. J Cell Sci, 1991. 99 ( Pt 2): p. 407-17.
369. Marshall, A.M., et al., *In vitro multipotent differentiation and barrier function of a human mammary epithelium*. Cell Tissue Res, 2009. 335(2): p. 383-95.
370. Seewaldt, V.L., et al., *Inhibition of retinoic acid receptor function in normal human mammary epithelial cells results in increased cellular proliferation and inhibits the formation of a polarized epithelium in vitro*. Exp Cell Res, 1997. 236(1): p. 16-28.
371. Montesano, R. and P. Soulie, *Retinoids induce lumen morphogenesis in mammary epithelial cells*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 23): p. 4419-31.
372. Offterdinger, M., S.M. Schneider, and T.W. Grunt, *Heregulin and retinoids synergistically induce branching morphogenesis of breast cancer cells cultivated in 3D collagen gels*. J Cell Physiol, 2003. 195(2): p. 260-75.
373. Gudas, L.J., *Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer*. Cell Growth Differ, 1992. 3(9): p. 655-62.
374. Yang, L.M., et al., *Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1999. 4(4): p. 377-88.
375. Seewaldt, V.L., et al., *Dysregulated expression of cyclin D1 in normal human mammary epithelial cells inhibits all-trans-retinoic acid-mediated G0/G1-phase arrest and differentiation in vitro*. Exp Cell Res, 1999. 249(1): p. 70-85.
376. Nakagawa, S., et al., *Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase*. Mol Carcinog, 2003. 38(3): p. 106-16.
377. Zhou, Q., M. Stetler-Stevenson, and P.S. Steeg, *Inhibition of cyclin D expression in human breast carcinoma cells by retinoids in vitro*. Oncogene, 1997. 15(1): p. 107-15.

378. Zhu, W.Y., et al., *Retinoic acid inhibition of cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells*. *Exp Cell Res*, 1997. 234(2): p. 293-9.
379. Dow, R., et al., *Retinoic acid-mediated growth arrest requires ubiquitylation and degradation of the F-box protein Skp2*. *J Biol Chem*, 2001. 276(49): p. 45945-51.
380. Teixeira, C. and M.A. Pratt, *CDK2 is a target for retinoic acid-mediated growth inhibition in MCF-7 human breast cancer cells*. *Mol Endocrinol*, 1997. 11(9): p. 1191-202.
381. del Rincon, S.V., et al., *Retinoic acid-induced growth arrest of MCF-7 cells involves the selective regulation of the IRS-1/PI 3-kinase/AKT pathway*. *Oncogene*, 2003. 22(22): p. 3353-60.
382. Donato, L.J., J.H. Suh, and N. Noy, *Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling*. *Cancer Res*, 2007. 67(2): p. 609-15.
383. Afonja, O., et al., *RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition*. *Oncogene*, 2002. 21(51): p. 7850-60.
384. Muller, P., et al., *SOX9 mediates the retinoic acid-induced HES-1 gene expression in human breast cancer cells*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. 120(2): p. 317-26.
385. Hong, T.K. and Y.C. Lee-Kim, *Effects of retinoic acid isomers on apoptosis and enzymatic antioxidant system in human breast cancer cells*. *Nutr Res Pract*, 2009. 3(2): p. 77-83.
386. Donato, L.J. and N. Noy, *Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling*. *Cancer Res*, 2005. 65(18): p. 8193-9.
387. Simeone, A.M. and A.M. Tari, *How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(12): p. 1475-84.
388. Chen, Y., et al., *Agonist and antagonist of retinoic acid receptors cause similar changes in gene expression and induce senescence-like growth arrest in MCF-7 breast carcinoma cells*. *Cancer Res*, 2006. 66(17): p. 8749-61.

389. Jing, Y., et al., *Upregulation of cytokeratins 8 and 18 in human breast cancer T47D cells is retinoid-specific and retinoic acid receptor-dependent*. *Differentiation*, 1996. 60(2): p. 109-17.
390. Hayden, L.J., et al., *Metabolic conversion of retinol to retinoic acid mediates the biological responsiveness of human mammary epithelial cells to retinol*. *J Cell Physiol*, 2001. 186(3): p. 437-47.
391. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *Human models for studying malignant progression in breast cancer*. *Eur J Cancer Prev*, 1993. 2 Suppl 3: p. 77-83.
392. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *Human models of breast cancer*. *Cancer Surv*, 1993. 16: p. 59-78.
393. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. *Breast Cancer Res*, 2008. 10(2): p. R25.
394. Pierce, G.B., Jr., F.J. Dixon, Jr., and E.L. Verney, *Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies*. *Lab Invest*, 1960. 9: p. 583-602.
395. Pierce, G.B. and W.C. Speers, *Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation*. *Cancer Res*, 1988. 48(8): p. 1996-2004.
396. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. 367(6464): p. 645-8.
397. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. 414(6859): p. 105-11.
398. Noel, A., et al., *Enhancement of tumorigenicity of human breast adenocarcinoma cells in nude mice by matrigel and fibroblasts*. *Br J Cancer*, 1993. 68(5): p. 909-15.
399. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(7): p. 3983-8.
400. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 106-10.

401. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 111-5.
402. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. 432(7015): p. 396-401.
403. Asselin-Labat, M.L., et al., *Delineating the epithelial hierarchy in the mouse mammary gland*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008. 73: p. 469-78.
404. Charafe-Jauffret, E., et al., *[Towards an integrated cellular and molecular: definition of breast cancers]*. *Med Sci (Paris)*, 2007. 23(6-7): p. 626-32.
405. Sorlie, T., et al., *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8418-23.
406. Dimri, G., H. Band, and V. Band, *Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models*. *Breast Cancer Res*, 2005. 7(4): p. 171-9.
407. Baum, B., J. Settleman, and M.P. Quinlan, *Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. 19(3): p. 294-308.
408. Bussard, K.M., et al., *Reprogramming Human Cancer Cells in the Mouse Mammary Gland*. *Cancer Res*, 2010.
409. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. 133(4): p. 704-15.
410. Hennessy, B.T., et al., *Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics*. *Cancer Res*, 2009. 69(10): p. 4116-24.
411. Liu, M., et al., *p21<sup>CIP1</sup> attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(45): p. 19035-9.
412. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation*. *Curr Mol Med*, 2009. 9(7): p. 873-86.
413. Rakha, E.A., J.S. Reis-Filho, and I.O. Ellis, *Combinatorial biomarker expression in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2010. 120(2): p. 293-308.

414. Cicatiello, L., et al., *Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs*. Am J Pathol, 2010. 176(5): p. 2113-30.
415. Abd El-Rehim, D.M., et al., *High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses*. Int J Cancer, 2005. 116(3): p. 340-50.
416. Anderson, W.F., et al., *Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database*. Breast Cancer Res Treat, 2002. 76(1): p. 27-36.
417. *Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. An overview of 61 randomized trials among 28,896 women*. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. N Engl J Med, 1988. 319(26): p. 1681-92.
418. Badve, S. and H. Nakshatri, *Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications*. J Clin Pathol, 2009. 62(1): p. 6-12.
419. Loi, S., *Molecular analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers: what have we learnt?* Eur J Cancer, 2008. 44(18): p. 2813-8.
420. Howell, S.J., S.R. Johnston, and A. Howell, *The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2004. 18(1): p. 47-66.
421. Jordan, V.C., *Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy*. Eur J Cancer, 2008. 44(1): p. 30-8.
422. Cummings, F.J., *Evolving uses of hormonal agents for breast cancer therapy*. Clin Ther, 2002. 24 Suppl C: p. C3-25.
423. Sotiriou, C., et al., *Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(18): p. 10393-8.
424. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. 406(6797): p. 747-52.



425. Weigelt, B., F.L. Baehner, and J.S. Reis-Filho, *The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade*. J Pathol, 2010. 220(2): p. 263-80.
426. Nanda, R., *Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in the treatment of breast cancer: recent advances and future directions*. Rev Recent Clin Trials, 2007. 2(2): p. 111-6.
427. Loi, S., et al., *Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade*. J Clin Oncol, 2007. 25(10): p. 1239-46.
428. Dandachi, N., O. Dietze, and C. Hauser-Kronberger, *Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma*. Lab Invest, 2002. 82(8): p. 1007-14.
429. Murphy, C.G. and M. Fornier, *HER2-positive breast cancer: beyond trastuzumab*. Oncology (Williston Park), 2010. 24(5): p. 410-5.
430. Seal, M.D. and S.K. Chia, *What is the difference between triple-negative and basal breast cancers?* Cancer J, 2010. 16(1): p. 12-6.
431. Bosch, A., et al., *Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research*. Cancer Treat Rev, 2010. 36(3): p. 206-15.
432. Yang, Q., et al., *5-aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor beta 2 demethylation, cell cycle arrest and growth inhibition in breast carcinoma cells*. Anticancer Res, 2002. 22(5): p. 2753-6.
433. Farias, E.F., et al., *Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells*. Cell Growth Differ, 2002. 13(8): p. 335-41.
434. Kupumbati, T.S., et al., *Dominant negative retinoic acid receptor initiates tumor formation in mice*. Mol Cancer, 2006. 5: p. 12.
435. Sun, S.Y. and R. Lotan, *Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. 41(1): p. 41-55.

436. Wald, N., et al., *Low serum-vitamin-A and subsequent risk of cancer. Preliminary results of a prospective study.* Lancet, 1980. 2(8199): p. 813-5.
437. Kark, J.D., et al., *Serum vitamin A (retinol) and cancer incidence in Evans County, Georgia.* J Natl Cancer Inst, 1981. 66(1): p. 7-16.
438. Formelli, F., et al., *Plasma retinol and prognosis of postmenopausal breast cancer patients.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. 18(1): p. 42-8.
439. Bhat, P.V. and A. Lacroix, *Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats.* Cancer Res, 1989. 49(1): p. 139-44.
440. Osanai, M., N. Sawada, and G.H. Lee, *Oncogenic and cell survival properties of the retinoic acid metabolizing enzyme, CYP26A1.* Oncogene, 2010. 29(8): p. 1135-44.
441. Koch, J.G., et al., *Mammary tumor modifiers in BALB/cJ mice heterozygous for p53.* Mamm Genome, 2007. 18(5): p. 300-9.
442. Howe, L.R., *Rexinoids and breast cancer prevention.* Clin Cancer Res, 2007. 13(20): p. 5983-7.
443. Yang, Q., T. Sakurai, and K. Kakudo, *Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2002. 76(2): p. 167-73.
444. Chatterjee, M. and M.R. Banerjee, *N-Nitrosodiethylamine-induced nodule-like alveolar lesion and its prevention by a retinoid in BALB/c mouse mammary glands in the whole organ in culture.* Carcinogenesis, 1982. 3(7): p. 801-4.
445. Lacroix, A., C. Doskas, and P.V. Bhat, *Inhibition of growth of established N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary cancer in rats by retinoic acid and ovariectomy.* Cancer Res, 1990. 50(18): p. 5731-4.
446. Lu, Y., et al., *Mechanism of inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 induced mammary oncogenesis by RARalpha agonist AM580.* Oncogene, 2010. 29(25): p. 3665-76.
447. Li, Y., et al., *The rexinoid, bexarotene, prevents the development of premalignant lesions in MMTV-erbB2 mice.* Br J Cancer, 2008. 98(8): p. 1380-8.

448. Anzano, M.A., et al., *Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen*. *Cancer Res*, 1994. 54(17): p. 4614-7.
449. Wu, K., et al., *Suppression of mammary tumorigenesis in transgenic mice by the RXR-selective retinoid, LGD1069*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2002. 11(5): p. 467-74.
450. Bryan, M., et al., *A pilot phase II trial of all-trans retinoic acid (Vesanoid) and paclitaxel (Taxol) in patients with recurrent or metastatic breast cancer*. *Invest New Drugs*, 2010.
451. Singletary, S.E., et al., *Phase II clinical trial of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and tamoxifen administration before definitive surgery for breast neoplasia*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(9): p. 2835-42.
452. Kurie, J.M., et al., *Phase I trial of 9-cis retinoic acid in adults with solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 1996. 2(2): p. 287-93.
453. Budd, G.T., et al., *Phase I/II trial of all-trans retinoic acid and tamoxifen in patients with advanced breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 1998. 4(3): p. 635-42.
454. Goss, P.E., et al., *Effects of liarozole fumarate (R85246) in combination with tamoxifen on N-methyl-N-nitrosourea (MNU)-induced mammary carcinoma and uterus in the rat model*. *BMC Cancer*, 2007. 7: p. 26.
455. Patel, J.B., et al., *Novel retinoic acid metabolism blocking agents endowed with multiple biological activities are efficient growth inhibitors of human breast and prostate cancer cells in vitro and a human breast tumor xenograft in nude mice*. *J Med Chem*, 2004. 47(27): p. 6716-29.
456. Van Heusden, J., et al., *Inhibition of all-TRANS-retinoic acid metabolism by R116010 induces antitumour activity*. *Br J Cancer*, 2002. 86(4): p. 605-11.
457. Van heusden, J., et al., *Liarozole potentiates the all-trans-retinoic acid-induced structural remodelling in human breast carcinoma MCF-7 cells in vitro*. *Eur J Cell Biol*, 1996. 71(1): p. 89-98.
458. Neve, R.M., et al., *A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes*. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 515-27.

459. Vernet, N., et al., *Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis*. *Endocrinology*, 2006. 147(1): p. 96-110.
460. Kane, M.A., et al., *Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2008. 80(5): p. 1702-8.
461. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10869-74.
462. Anderson, E., R.B. Clarke, and A. Howell, *Estrogen responsiveness and control of normal human breast proliferation*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998. 3(1): p. 23-35.
463. Han, Q.X., et al., *Elevated expression of retinoic acid receptor-alpha (RAR alpha) in estrogen-receptor-positive breast carcinomas as detected by immunohistochemistry*. *Diagn Mol Pathol*, 1997. 6(1): p. 42-8.
464. Sun, G., W. Porter, and S. Safe, *Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex*. *Mol Endocrinol*, 1998. 12(6): p. 882-90.
465. Dawson, M.I., et al., *Correlation of retinoid binding affinity to retinoic acid receptor alpha with retinoid inhibition of growth of estrogen receptor-positive MCF-7 mammary carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1995. 55(19): p. 4446-51.
466. Ross-Innes, C.S., et al., *Cooperative interaction between retinoic acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer*. *Genes Dev*, 2010. 24(2): p. 171-82.
467. Klinge, C.M., et al., *Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors*. *J Mol Endocrinol*, 2004. 33(2): p. 387-410.
468. Hao, H., et al., *Estrogen-induced and TAFII30-mediated gene repression by direct recruitment of the estrogen receptor and co-repressors to the core promoter and its reversal by tamoxifen*. *Oncogene*, 2007. 26(57): p. 7872-84.
469. Cho, Y. and D.A. Talmage, *Protein kinase Calpha expression confers retinoic acid sensitivity on MDA-MB-231 human breast cancer cells*. *Exp Cell Res*, 2001. 269(1): p. 97-108.

470. Pratt, M.A., M. Niu, and D. White, *Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids*. J Cell Biochem, 2003. 90(4): p. 692-708.
471. Son, S.H., et al., *Retinoic acid attenuates promyelocytic leukemia protein-induced cell death in breast cancer cells by activation of the ubiquitin-proteasome pathway*. Cancer Lett, 2007. 247(2): p. 213-23.
472. Moon, H.S., et al., *Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPARgamma and inhibition of ERK 1 / 2*. Cancer Sci, 2010. 101(2): p. 396-402.
473. Sun, H., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells*. Cancer Res, 2008. 68(8): p. 2912-9.
474. Bhat, P.V., et al., *Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation*. Gene, 1995. 166(2): p. 303-6.
475. Zhao, D., et al., *Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase*. Eur J Biochem, 1996. 240(1): p. 15-22.
476. Moore, S.A., et al., *A structural explanation for the retinal specificity of class I ALDH enzymes*. Adv Exp Med Biol, 1999. 463: p. 27-38.
477. Moore, S.A., et al., *Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class I aldehyde dehydrogenases*. Structure, 1998. 6(12): p. 1541-51.
478. Dickinson, F.M., *Studies on the mechanism of sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase*. Biochem J, 1985. 225(1): p. 159-65.
479. Lamb, A.L. and M.E. Newcomer, *The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity*. Biochemistry, 1999. 38(19): p. 6003-11.
480. Deng, S., et al., *Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers*. PLoS One, 2010. 5(4): p. e10277.

481. Morimoto, K., et al., *Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression*. *Cancer Sci*, 2009. 100(6): p. 1062-8.
482. Charafe-Jauffret, E., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(1): p. 45-55.
483. Stingl, J., et al., *Epithelial progenitors in the normal human mammary gland*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005. 10(1): p. 49-59.
484. Lim, E., et al., *Transcriptome analyses of mouse and human mammary cell subpopulations reveal multiple conserved genes and pathways*. *Breast Cancer Res*, 2010. 12(2): p. R21.
485. Korkaya, H., et al., *HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion*. *Oncogene*, 2008. 27(47): p. 6120-30.
486. Sreerama, L. and N.E. Sladek, *Cellular levels of class 1 and class 3 aldehyde dehydrogenases and certain other drug-metabolizing enzymes in human breast malignancies*. *Clin Cancer Res*, 1997. 3(11): p. 1901-14.
487. Ozolins, T.R., *Cyclophosphamide and the Teratology society: an awkward marriage*. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010. 89(4): p. 289-99.
488. Ginestier, C., et al., *Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation*. *Cell Cycle*, 2009. 8(20): p. 3297-302.
489. Metzger, D. and R. Feil, *Engineering the mouse genome by site-specific recombination*. *Curr Opin Biotechnol*, 1999. 10(5): p. 470-6.
490. Hundley, J.E., et al., *Differential regulation of cell cycle characteristics and apoptosis in MMTV-myc and MMTV-ras mouse mammary tumors*. *Cancer Res*, 1997. 57(4): p. 600-3.