

Université de Montréal

**Signalisation par les récepteurs des œstrogènes  
Mécanismes de reconnaissance de l'ADN et  
nouvelles approches pharmacologiques d'inhibition**

par

Virginie DUPONT

Département de Biochimie

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en Biochimie

Juin, 2011

© Virginie Dupont, 2011



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Signalisation par les récepteurs des œstrogènes :  
Mécanismes de reconnaissance de l'ADN et nouvelles approches  
pharmacologiques d'inhibition

Présentée par :  
Virginie Dupont

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michel Bouvier, président-rapporteur  
Dr. Sylvie Mader, directeur de recherche  
Dr. Alain Moreau, membre du jury  
Dr. Marc Basik, examinateur externe  
Dr. Gilles Bleau, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Malgré les progrès des traitements des cancers du sein, ceux-ci demeurent la seconde cause de mortalité par cancer au Canada. Parmi les gènes associés aux cancers du sein, le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  est exprimé dans plus de 70% des tumeurs mammaires, qui prolifèrent en réponse aux œstrogènes, faisant de lui une cible de choix.

ER $\alpha$  est un facteur de transcription ligand-dépendant, liant des éléments de réponse PuGGTCAnnnTGACCPy. Afin d'examiner la capacité des récepteurs nucléaires à reconnaître de nouveaux motifs ADN, des mutants aux capacités de liaison modifiées ont été générés. Parmi les quatre résidus interagissant avec l'ADN, R211 ne peut pas être modifiée sans perdre complètement la liaison du récepteur à l'ADN. Néanmoins, les mutations combinées de plusieurs acides aminés contactant les bases de l'ERE ont généré des récepteurs capables de reconnaître de nouveaux motifs, tout en conservant des niveaux de transactivation efficaces. L'utilisation potentielle des récepteurs nucléaires comme outils de thérapie génique hormono-dépendant, repose sur la prédiction des motifs de liaison efficaces.

Étant donné son importance dans la carcinogenèse mammaire, ER $\alpha$  est une cible cruciale des thérapies anti-néoplastiques. L'anti-œstrogène total, ICI, induit la dégradation de ER $\alpha$  et l'arrêt de la croissance des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives. De plus, la nouvelle drogue anti-tumorale HDACi, SAHA, module la voie de signalisation des œstrogènes et possède des propriétés prometteuses en association avec d'autres traitements anti-tumoraux. En effet, le co-traitement ICI et SAHA a un impact synergique sur l'inhibition de la prolifération des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives. Cette synergie repose sur la coopération des effets de ICI et SAHA pour réduire les niveaux protéiques de ER $\alpha$  et bloquer la progression du cycle cellulaire via la modulation de la transcription des gènes cibles des œstrogènes. En fait, les fortes doses de HDACis masquent rapidement et complètement la signalisation transcriptionnelle des œstrogènes. De plus, les gènes cibles primaires des œstrogènes, contenant des EREs, présentent la même régulation transcriptionnelle en réponse aux fortes doses de SAHA ou du co-traitement, avec des doses utilisables en clinique de ICI et SAHA. En fait, ICI mime l'impact des fortes doses de SAHA, en dégradant ER $\alpha$ , potentialisant ainsi la répression de la transcription ERE-dépendante par SAHA. Finalement, la synergie des effets de ICI et SAHA pourrait augmenter l'efficacité des traitements des tumeurs mammaires.

**Mots-clés** : récepteurs des œstrogènes, liaison à l'ADN, anti-œstrogènes totaux, inhibiteurs des HDACs, cancer du sein



## Abstract

Despite the progress in breast cancer therapy, it is still the second cause of death by cancer in the western world. The estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) is expressed in more than 70% of breast tumors, which then proliferate in response to E2 stimulation.

ER $\alpha$  is a ligand-dependant transcription factor, which binds to palindromic response elements composed of PuGGTCA motifs. In order to examine the capacity of nuclear receptors to be tailored to recognize novel DNA motifs, rational design of ER $\alpha$  mutants with altered binding specificity were achieved. Of the four amino-acids interacting with DNA, R211 cannot be altered to another residu without a complete loss of DNA binding. However, combined mutagenesis of the amino-acids contacting the bases of the ERE generate receptors that recognized a new type of motifs with efficient transcriptional transactivation levels. In order to consider nuclear receptors as potential hormonal-dependent tools for genetic therapy, bio-informatic models predicting DNA binding are needed.

Considering its importance in breast carcinogenesis, ER $\alpha$  is a crucial target for anti-neoplastic therapies. The full anti-estrogen ICI provokes ER $\alpha$  degradation and ER $\alpha$ -positive breast cancer growth arrest. Moreover, the new HDACi anti-tumoral drug, SAHA modulates the estrogen pathway and have promising properties in association with other anti-neoplastic drugs. In this context, our goal was to determine the effects of the ICI and SAHA combined treatment on breast cancer cell proliferation. The combined treatment has a synergistic impact on inhibiting ER $\alpha$ -positive breast cancer cell growth. It occurs through the cooperation of ICI and SAHA to reduce ER $\alpha$  protein level, and to block the cell cycle progression through the transcriptional regulation of E2-target genes. Actually, high doses of HDACis completely and rapidly mask E2-transcriptional signaling. Moreover, primary E2-target genes show the same transcriptional regulation in presence of high doses of SAHA as with the co-treatment, using clinically feasible doses of ICI and SAHA. In fact, ICI mimics the impact of high doses of SAHA through ER $\alpha$  degradation, and then potentiate the repressional effect of low doses of SAHA on ERE-dependant transcription. Finally, the synergy of ICI and SAHA might increase the potency of breast cancer therapy.

**Keywords** : estrogen receptor, DNA binding, full anti-estrogen, HDAC inhibitors, breast cancer





# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES ŒSTROGÈNES</b> .....	<b>5</b>
1.1. <i>Naissance d'un concept : les hormones et leurs récepteurs nucléaires</i> .....	5
1.1.1. La petite histoire des œstrogènes .....	5
1.1.2. La révolution des récepteurs nucléaires .....	6
1.2. <i>Rôles des œstrogènes dans les grands systèmes physiologiques</i> .....	8
1.2.1. Synthèse des œstrogènes .....	8
1.2.2. Distribution des récepteurs des œstrogènes au sein de leurs tissus cibles .....	10
1.2.3. Œstrogènes et système reproducteur .....	12
Œstrogènes et développement du tractus reproducteur féminin .....	12
Œstrogènes et cycle ovarien .....	14
Œstrogènes et reproduction masculine .....	14
1.2.4. Œstrogènes et système osseux.....	16
1.2.5. Œstrogènes et système nerveux.....	16
1.2.6. Œstrogènes et système cardiovasculaire.....	17
1.3. <i>Œstrogènes et cancers</i> .....	18
<b>2. CANCER DU SEIN ET ŒSTROGÈNES</b> .....	<b>19</b>
2.1. <i>Épidémiologie du cancer du sein au Canada</i> .....	19
2.2. <i>Facteurs de risque du cancer du sein</i> .....	22
2.3. <i>Classification des tumeurs mammaires</i> .....	23
2.4. <i>Rôle des œstrogènes dans la carcinogenèse mammaire</i> .....	25
2.5. <i>Le cancer du sein et ses traitements à travers l'histoire</i> .....	27
2.5.1. De l'Égypte ancienne au XXI <sup>ème</sup> siècle.....	27
Le temps de la chirurgie .....	27
La naissance des traitements adjuvants .....	28
2.5.2. Traitements des cancers du sein de nos jours .....	28
Chirurgies actuelles .....	30
Radiothérapie .....	30
Chimiothérapie.....	30
Anticorps monoclonaux.....	31
Hormonothérapie.....	31
2.6. <i>Les anti-œstrogènes comme agents anti-tumoraux</i> .....	32
2.6.1. Un siècle de traitements hormonaux : de l'ovariectomie aux anti-œstrogènes.....	32
2.6.2. Anti-œstrogènes partiels .....	33
2.6.3. Anti-œstrogènes totaux .....	35

3. LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES COMME MÉDIATEURS DE L'ACTION DES ŒSTROGÈNES : MÉCANISMES	37
3.1. <i>Organisation modulaire des récepteurs nucléaires : relation structure/fonction</i>	38
3.1.1. Dualité de fonction : récepteur et facteur de transcription	38
3.1.2. Modèle d'action général des récepteurs nucléaires	40
3.1.2.1. Spécificité de liaison à l'ADN	40
Critères de la spécificité de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires	40
Liaison des récepteurs des œstrogènes à leurs éléments de réponse ADN, les EREs	42
3.1.2.1. Modèles bio-informatiques de prédiction de la liaison des facteurs de transcription à l'ADN	48
3.2. <i>Signalisation des œstrogènes par leur récepteur ER<math>\alpha</math></i>	50
3.2.1. Voie génomique ERE-dépendante classique	52
3.2.2. Impact de la liaison du ligand sur l'activation de la transcription hormono-dépendante : importance de l'hélice H12	52
3.2.2.1. Gènes cibles des œstrogènes et EREs	54
3.2.2.2. Modèle dynamique de transcription œstrogène-dépendante	57
3.2.3. Voie génomique ERE-indépendante	58
3.2.4. Voie non-génomique : effets rapides des œstrogènes	59
3.2.5. Voie non-génomique à génomique : voie ligand-indépendante	60
3.2.6. Modulation de la signalisation œstrogénique par les modifications post-traductionnelles de ER $\alpha$	61
3.3. <i>Mécanismes d'action des anti-œstrogènes</i>	63
3.3.1. Anti-œstrogènes partiels : entre antagonistes et agonistes des récepteurs des œstrogènes	63
3.3.2. Anti-œstrogènes totaux	65
3.4. <i>Régulation de l'expression génique de ER<math>\alpha</math></i>	67
Promoteurs alternatifs de ESR1	67
Régulation épigénétique de l'expression de ER $\alpha$	69
4. VERS DE NOUVEAUX TRAITEMENTS ANTI-TUMORAUX : LES INHIBITEURS DES HISTONES DÉACÉTYLASES	72
4.1. <i>Les présentations : classification des HDACs</i>	73
4.2. <i>Rôles des HDACs</i>	73
4.2.1. HDACs, histones et transcription	76
4.2.2. Autres substrats, autres rôles des HDACs	78
4.3. <i>Les HDACs comme cibles des traitement anti-tumoraux</i>	80

4.4. Les HDACis comme agents anti-tumoraux.....	81
4.4.1. Histoire récente des HDACis comme anti-tumoraux .....	81
4.4.2. Les HDACis et les mille et uns essais cliniques .....	84
4.5. Mode d'action des HDACis.....	86
4.5.1. Mécanisme d'action général des HDACis.....	86
4.5.2. Les HDACis comme inducteurs d'apoptose .....	87
4.5.3. Les HDACis comme inhibiteurs du cycle cellulaire.....	88
4.5.4. Propriétés anti-angiogéniques et anti-métastatiques des HDACis .....	88
4.5.5. Impact des HDACis sur le système osseux .....	88
4.5.6. Impact de la modulation de l'acétylation des protéines cytoplasmiques.....	89
4.5.7. Impact de la modulation de l'acétylation des facteurs de transcription .....	90
4.6. HDACis et voie de signalisation des œstrogènes.....	90
4.6.1. Effets de l'acétylation de ER $\alpha$ .....	90
4.6.2. Effets des HDACis dans les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -négatives : sensibilisation aux anti-œstrogènes .....	91
4.6.3. Effets des HDACis sur la voie de signalisation des œstrogènes dans les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives .....	92
<b>OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES .....</b>	<b>95</b>
<b>ARTICLE 1 .....</b>	<b>101</b>
Contribution des auteurs :.....	103
<b>ARTICLE 2 .....</b>	<b>119</b>
Contribution des auteurs :.....	121
<b>ARTICLE 3 .....</b>	<b>163</b>
Contribution des auteurs :.....	165

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>223</b>
1. SPÉCIFICITÉ DE LIAISON À L'ADN DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES.....	226
1.1. <i>Rôle crucial de R211 dans la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN</i> .....	227
1.2. <i>Conservation et interdépendance de certains acides aminés des récepteurs nucléaires intra- et inter-espèces</i> .....	229
1.3. <i>Genèse de nouvelles spécificités de liaison</i> .....	235
1.3.1. duplicité des rôles de K206 : des mutants oscillant entre relâchement et nouvelle spécificité de liaison.....	235
1.3.2. Cas complexe de E203 et K210 : interdépendance et nouvelle spécificité de liaison	239
1.3.3. De l'interdépendance des acides aminés à la thérapie génique via la genèse de mutants présentant de nouvelles spécificités de liaison .....	241
1.4. <i>Les récepteurs nucléaires : de futurs outils pour la thérapie génique ?</i> .....	242
1.5. <i>Difficultés liées à l'utilisation de modèles bio-informatiques pour prédire les séquences ADN liées par les récepteurs nucléaires</i> .....	244
2. ASSOCIATION DES ANTI-ŒSTROGÈNES ET DES INHIBITEURS DE HDACS POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS DU SEIN ER $\alpha$ -POSITIFS .....	248
2.1. <i>Mécanismes des effets synergiques de ICI et SAHA sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales mammaires ER<math>\alpha</math>-positives</i> .....	249
2.1.1. Modulation de la transcription des gènes cibles des œstrogènes et cycle cellulaire	251
2.1.2. Rôle de l'apoptose dans la synergie .....	253
2.1.3. Implication de ER $\beta$ dans la synergie .....	254
2.2. <i>Régulation de la transcription œstrogène-dépendante par les HDACis et potentialisation par ICI</i> .....	258
2.2.1. Impact des HDACis sur la transcription œstrogène-dépendante .....	258
2.2.1.1. TSA masque rapidement les effets des œstrogènes .....	258
2.2.1.2. Effets indirects de TSA sur la transcription des gènes cibles des œstrogènes via la déplétion de ER $\alpha$ .....	261
2.2.1.3. Effet bi-modal des HDACis sur la transcription ERE-dépendante induite par les œstrogènes .....	262
2.2.2. Potentialisation des effets des HDACis sur la transcription œstrogène-dépendante par ICI.....	266
2.3. <i>Conclusions et perspectives</i> .....	267
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>269</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>I</b>

## Liste des Tableaux

- Tableau I : Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein au Canada en 2010
- Tableau II : Activités biologiques des ligands des récepteurs des œstrogènes dans leurs tissus cibles
- Tableau III : Hélice de reconnaissance à l'ADN des récepteurs nucléaires en lien avec l'organisation de leurs éléments de réponse ADN
- Tableau IV : Structure du  $17\beta$ -œstradiol et de différents anti-œstrogènes partiels ou totaux
- Tableau V : Implication des HDACs des classes I, II et IV dans les processus cellulaires et leur expression dans les cancers
- Tableau VI : Spécificité d'action des membres des différentes classes de HDACs et leurs progressions dans les essais cliniques
- Tableau VII : Exemples de structure de HDACs
- Tableau VIII : Fréquences des acides aminés majoritaires aux positions 203, 206 et 210 chez *H. sapiens*, *D. melanogaster* et *C. elegans*
- Tableau IX : Fréquences théoriques, considérant les acides aminés aux positions 203 et 206 comme indépendants, et fréquences observées au sein des récepteurs nucléaires humains
- Tableau X : Comparaison des charges présentées par les acides aminés aux positions 203 et 206



## Liste des figures

Figure 1 : Impact des récepteurs nucléaires sur physiologie et la physiopathologie

Figure 2 : Biosynthèse simplifiée des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol

Figure 3 : Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Figure 4 : Effets positifs et négatifs des œstrogènes sur la physiologie féminine

Figure 5 : La glande mammaire et son développement

Figure 6 : Évolution des taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein au Canada entre 1980 et 2010

Figure 7 : Estimation du nombre de nouveaux cas et de décès par cancer du sein selon les groupes d'âge des femmes canadiennes en 2010

Figure 8 : Relation possible entre le modèle de développement hiérarchique des cellules épithéliales de la glande mammaire et les différents sous-types de tumeurs mammaires

Figure 9 : Processus cellulaires impliqués dans la tumorigenèse

Figure 10 : Extrait du papyrus d'Edwin Smith.

Figure 11 : De la mastectomie étendue à la lumpectomie : évolution avec le temps

Figure 12 : Organisation modulaire des récepteurs nucléaires : exemple du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$

Figure 13 : Modèle d'action classique des récepteurs nucléaires hormonaux

Figure 14 : Mode de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires

Figure 15 : Séquence consensus de l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE)

Figure 16 : Représentation schématique de la séquence primaire du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$

Figure 17 : Modélisation de la liaison d'un dimère de DBD de ER $\alpha$  à l'ERE consensus

Figure 18 : Interactions entre les acides aminés de ER $\alpha$  et les bases de l'ERE

Figure 19 : Conceptualisation de la liaison des ERs à l'ADN.

Figure 20 : Les différentes voies de signalisation des œstrogènes

Figure 21 : Voie de signalisation des œstrogènes ERE-dépendante

Figure 22 : Conformations agonistes et antagonistes du LBD des récepteurs des œstrogènes en fonction des ligands

Figure 23 : Localisation des sites de modifications post-traductionnelles de ER $\alpha$

Figure 24 : Organisation génomique de la région promotrice du gène ESR1 humain : promoteurs alternatifs

Figure 25 : Pharmacologie tripartite des récepteurs des œstrogènes

Figure 26 : Membres de la famille des HDACs : organisation, localisation et principaux inhibiteurs

Figure 27 : Modulation de la transcription par la balance des activités HAT et HDAC

Figure 28 : Effets de l'inhibition des HDACs par les HDACis

Figure 29 : Régulation de la transcription de ESR2 par ICI et SAHA



## Liste des abréviations

A	Alanine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AE	Anti-œstrogènes
AF-1	Fonction 1 d'activation
AF-2	Fonction 2 d'activation
ALPPL2	Gène de l'alkaline phosphatase 2
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
AR	Récepteur des androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1	Récepteur de l'angiotensine II
BIRC5	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 5</i>
BSA	Albumine de sérum bovin
CARM1	<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CCND1	Gene de la cycline D1
CDC25A	<i>Cell division control protein 25A</i>
c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
C-terminal	Carboxy-terminal
D	Acide aspartique
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Acide glutamique
E2	17 $\beta$ -œstradiol
ER	Récepteur des oestrogènes
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
F	Phénylalanine
FBS	Sérum fœtal de bovins

FBST	Sérum fœtal de bovins traité
FSH	Hormone folliculo-stimulante
G	Glycine
GnRH	Gonadolibérine ou <i>Gonadotropin Releasing Hormone</i>
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
HAT	Histone acétyl-transférase
HDAC	Histone désacétylase
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HSB	Tampon à haute teneur en sel
I	Isoleucine
ICI	ICI 182.780
K	Lysine
L	Leucine
LBD	Domaine de liaison au ligand
LCoR	<i>Ligand-dependent corepressor</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	Hormone lutéïnisante
M	Méthionine
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
N	Asparagine
NCoA	<i>Nuclear receptor co-activator</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NO	<i>Nitric oxyde</i>
NR	Récepteur nucléaire
NRIP-1	<i>Nuclear receptor interacting protein 1</i>
N-term	Amino-terminal
PBS	Tampon salin de phosphate
PCR	<i>Polycloning chain reaction</i>
PNR	<i>Photoreceptor cell-specific nuclear receptor</i>
PR	Récepteur à la progestérone
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
Pu	Purine

Py	Pyrimidine
Q	Glutamine
R	Arginine
RIP140	<i>Receptor interacting protein 140</i>
RXR	<i>Retinoid X receptor</i>
S	Sérine
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor</i>
SRC	<i>Steroid receptor coactivator</i>
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TFII	<i>Transcription factor II</i>
TIF-2	<i>Transcription intermediary factor 2</i>
TLX	Homologue du gène de <i>Drosophile tailless</i>
TR	<i>Thyroid receptor</i>
TRAP220	<i>Thyroid hormone receptor-associated protein complex component</i>
TRIP1	<i>Thyroid receptor interacting protein 1</i>
TSS	<i>Transcription start site</i>
V	Valine
W	Tryptophane
X	Acide aminé quelconque
Y	Tyrosine



## Remerciements

En tout premier lieu, je souhaiterais remercier les membres du jury, les Drs. Michel Bouvier, Alain Moreau et Mark Basik de participer à la dernière étape de la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr. Sylvie Mader qui m'a accepté dans son laboratoire et permis d'y réaliser mes travaux recherches. Elle m'a également incité à me dépasser, à développer ma persévérance et ma détermination.

Les Drs. Léa Brakier-Gingras, Normand Brisson et Michel Bouvier sont des acteurs importants de l'aboutissement de cette thèse, du début de sa rédaction à sa relecture afin de permettre son dépôt officiel. Je leur en suis extrêmement reconnaissante. Le Dr. Michel Bouvier a participé activement à ma progression en tant que président de jury de chacun de mes comités de thèse. Je respecte tout particulièrement son impartialité et son professionnalisme sans faille. J'ai également beaucoup apprécié sa capacité à improviser lors mon premier comité de thèse qui s'est tenu... dans son salon.

Je souhaite également saisir cette occasion pour remercier Mme Décarie, Ombudsman de l'Université de Montréal, pour ses conseils et son efficacité afin que je termine ma thèse dans les meilleures conditions possibles. Je remercie également le département de Biochimie, à travers les Drs. Christian Baron et Luc Desgroseillers, pour leur participation active dans ce dossier.

Je ne peux pas non plus oublier le soutien infaillible dont j'ai bénéficié auprès du Dr. Muriel Aubry depuis plusieurs années. Son aide fut des plus précieuses, tout comme ses conseils judicieux qui m'ont permis de nombreuses fois de réagir positivement face aux difficultés.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury d'examen pré-doctoral, examen duquel je suis sortie grandie, les Drs. Marc Basik et Martine Raymond dont le professionnalisme d'une inestimable efficacité et la pertinence des conseils m'ont été bénéfique.

Je suis également reconnaissante au Dr. Daniel Chevrier de m'avoir offert la chance de donner des démonstrations de travaux pratiques, dans une ambiance des plus agréable, au Département de Biochimie. J'ai également beaucoup apprécié de me voir offrir plus de charges au moment où j'en avais besoin.

Finalement, le Département de Biochimie ne serait pas ce qu'il est sans Sylvie Beauchemin, dont la patience et la gentillesse envers les étudiants « en détresse » est légendaire.

Je remercie également le département de Biochimie, la F.E.S. et le M.C.E.T.C. pour leur soutien financier pendant ma thèse.

Je souhaite également remercier chaudement plusieurs membres du laboratoire passé et présent. Élise Hébert et Julie Deschène m'ont accueillie au sein du laboratoire et épaulé au démarrage mes projets de recherche. Walter avait toujours la réponse aux questions que l'on pouvait se poser. Martine Bail se doit aussi d'être remercier pour le travail que nous avons effectué ensemble afin de mettre la touche finale à l'article 1 et pour son aide technique dans l'avancement de l'article 2, dans le moment stressant qui précède l'examen pré-doctoral. Je tiens à remercier David Laperrière qui m'a permis d'ajouter une dimension bio-informatique à mes articles en trouvant des réponses à toutes mes interrogations, pour sa disponibilité et pour son calme soutien. Slim Fourati a permis l'analyse bio-informatique qui a confirmé l'aspect prometteur de la co-administration des drogues ICI et SAHA.

Sur un plan plus affectif, je souhaite mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler avec Élise, Julie, Walter et Noor. Leur amitié, leurs conseils et leur soutien sans faille furent d'une grande valeur. J'ai également été ravie de rencontrer Khalid Hilmi, mon voisin de paillasse préféré et Edlie Saint-Hilaire dont la gentillesse n'a pas de borne.

Finalement, la thèse représente un parcours professionnel difficile. J'ai eu la chance de passer au travers avec l'appui d'une vie privée stable et pleine d'amour. Merci Aurélien pour ton soutien, ton écoute, ta compréhension du début à la toute fin de cette expérience. Et pour finir, merci pti Flo, merci papa, merci maman!

*“A lady with growth neoplastic  
Thought surgical ablation too drastic.  
She preferred that her ill  
Could be cured with a pill,  
Which today is no longer fantastic.”*

Elwood Jensen





## **INTRODUCTION**



Il suffit d'une cellule... La rencontre d'un gamète femelle et d'un gamète mâle crée la 1<sup>ère</sup> cellule qui nous constitue. Elle seule va donner naissance aux milliards de cellules qui s'agencent et fonctionnent en harmonie pour faire de nous des êtres en bonne santé. Seulement, il suffit d'une cellule aussi pour faire naître un cancer. L'accumulation de mutations dans une seule cellule peut lui conférer des avantages sélectifs et conduire à la formation d'une tumeur.

Malgré d'énormes progrès en matière de prévention et de traitement, le cancer du sein demeure une épreuve pour les patientes et leur famille, et un enjeu de taille pour la société. Une femme sur neuf sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie et parmi elles, une sur 28 en mourra. La chirurgie et ses traitements adjuvants permettent, dans bien des cas, de soigner ces patientes. Cependant, la bataille n'est pas gagnée et pour les patientes, les traitements sont lourds de conséquences à court et à long terme. L'implication des œstrogènes et de leur récepteur, ER $\alpha$ , permet aux patientes atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ -positifs de recevoir un traitement hormonal, qui, bien qu'ayant été révolutionnaire, reste à améliorer. Son administration en combinaison avec d'autres drogues ne pourrait-il pas permettre de traiter toutes les tumeurs mammaires ? Cela ne permettrait-il pas de réduire les doses efficaces afin de réduire les effets secondaires indésirables ? Le récepteur des œstrogènes, et avec lui les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires, ne pourraient-ils pas être utilisés autrement en thérapie ? De nombreuses recherches sont en cours afin de répondre à ces questions.



## 1. PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DES ŒSTROGÈNES

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes lipophiles dérivées du cholestérol. Elles jouent un rôle prépondérant dans la reproduction féminine tout en étant impliquées dans de nombreuses autres fonctions physiologiques telles que l'homéostasie osseuse ou la modulation du taux de HDL (lipoprotéine de haute densité) par rapport aux LDL (lipoprotéine de faible densité).

### 1.1. NAISSANCE D'UN CONCEPT : LES HORMONES ET LEURS RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

#### 1.1.1. LA PETITE HISTOIRE DES ŒSTROGÈNES

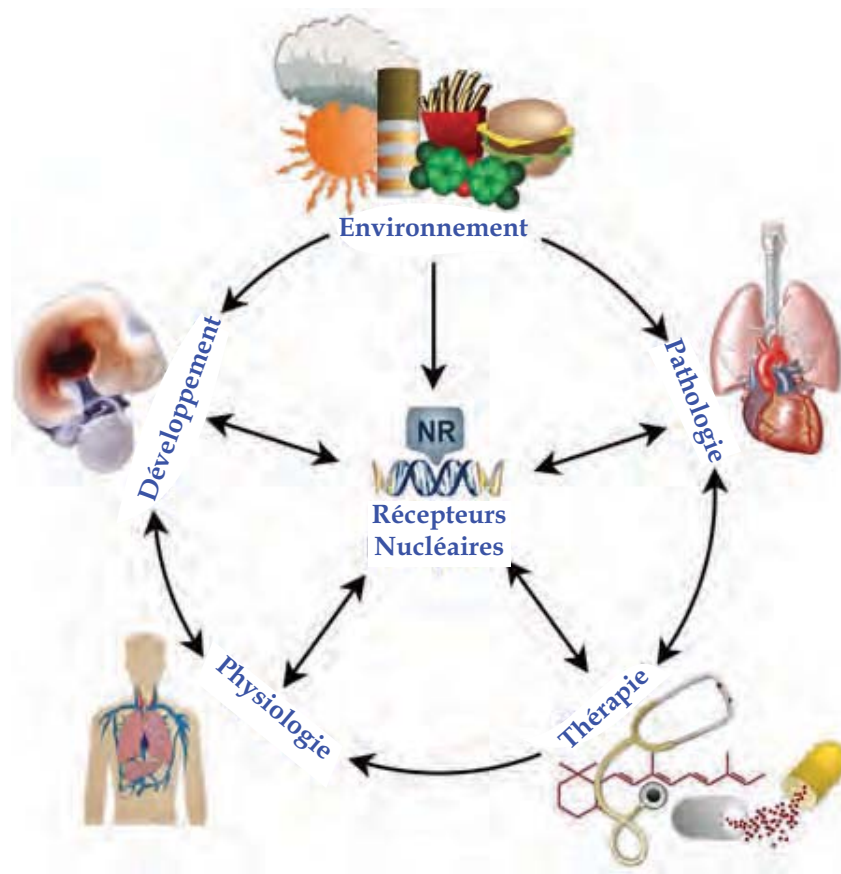
La petite histoire des œstrogènes commence avec la naissance du concept de communication entre les organes énoncée par Claude Bernard dans les années 1850. Des « sécrétions internes » seraient produites par certaines structures anatomiques friables et vascularisées et seraient très importantes pour l'organisme. Il faudra attendre plus de 50 ans les travaux d'Ernest Starling et William Bayliss pour mettre en évidence la « sécrétine », une substance libérée par le duodénum au contact des aliments, qui déclenche la sécrétion d'enzymes digestives par le pancréas. Ainsi naquirent les « hormones », ces substances qui ont une fonction de « messenger chimique » d'un organe à un autre en passant par la circulation sanguine (Starling, 1905). Une trentaine d'années plus tard, en 1929, l'œstrone est purifiée à partir d'urine, par Edward A. Doisy aux États-Unis et Adolf Butenandt en Allemagne. Quelques sept ans plus tard, Doisy met en évidence la présence d'œstradiol dans les ovaires de porc. A ce moment, même si le concept d'hormone est né, les récepteurs hormonaux sont encore loin.

### 1.1.2. LA RÉVOLUTION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

L'histoire des récepteurs des œstrogènes commence dans les années 1960 avec l'identification des protéines liées par les hormones. Elles ont été identifiées à l'aide de ligands radioactifs par E. Jensen (Jensen *et al.*, 1962). Ces protéines étant connues pour transloquer du cytoplasme au noyau, un lien entre la physiologie et le contrôle transcriptionnel est présumé. Il faudra attendre encore une quinzaine d'années avant que les gènes des hormones stéroïdiennes ne soient découverts par P. Chambon et B. O'Malley. Ainsi, au début des années 1980, le modèle classique de l'action des hormones stéroïdiennes est né : leur caractère lipophile leur permet de traverser la bicouche lipidique membranaire pour se lier à leurs récepteurs spécifiques. Cette liaison provoque un changement allostérique, qui permet au complexe de lier des sites hautement spécifiques sur la chromatine et de moduler la transcription des gènes cibles. Dès lors, les récepteurs de ces hormones sont d'ores et déjà considérés comme des facteurs de transcription ligand-dépendant.

Alors que l'ère pré-clonage a permis la mise en place du modèle classique d'action des hormones stéroïdiennes ainsi que la définition des récepteurs hormonaux comme facteurs de transcription ligand-dépendant, l'ère du clonage va donner naissance à la famille des récepteurs nucléaires.

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) fût le premier récepteur nucléaire cloné (Weinberger *et al.*, 1985), suivie de près par le récepteur des œstrogènes alpha (ER $\alpha$ ) par les équipes de P. Chambon et J. Shine, en 1986 (Walter *et al.*, 1985) (Green *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1986). Au cours des années suivantes, de nombreux récepteurs nucléaires ont été identifiés par homologie de séquence puis clonés. Les récepteurs nucléaires de toutes les hormones connues sont alors identifiés, de même que les récepteurs orphelins. La superfamille des récepteurs nucléaires humains est née. En 1991, elle devient inter-espèce : le 1er récepteur nucléaire d'insecte est identifié par M.R. Koelle (Koelle *et al.*, 1991). Cette découverte suggère la nature universelle des récepteurs nucléaires et met également en évidence le fait qu'ils ont évolués avant la divergence entre les Vertébrés et les Invertébrés. Aujourd'hui, la famille des récepteurs nucléaires est composée de plus de 300 membres au sein d'une



*Figure 1 : Impact des récepteurs nucléaires sur la physiologie et la physiopathologie humaine*

La famille des récepteurs nucléaires est constituée de facteurs de transcription ligand-dépendant. Ses membres, dont les récepteurs des œstrogènes ou de l'acide rétinoïque, ont un impact primordiale sur le développement embryonnaire et sur de nombreux processus physiologiques. De part leur dépendance vis-à-vis de leur ligands respectifs, ils permettent à l'organisme de répondre adéquatement à des stimuli, notamment environnementaux. De plus, leur implication dans de nombreuses pathologies, telles que l'inflammation ou l'ostéoporose, en font des cibles thérapeutiques de choix. Leurs activités sont modulées par les agonistes ou des antagonistes naturels ou synthétiques.

Adaptée de National Institute of Environmental Health Sciences, 2010

grande diversité d'organismes, des levures aux êtres humains, en passant par les vers. Ils jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire et ont un impact sur de nombreuses fonctions physiologiques et par conséquent physiopathologiques (figure 1).

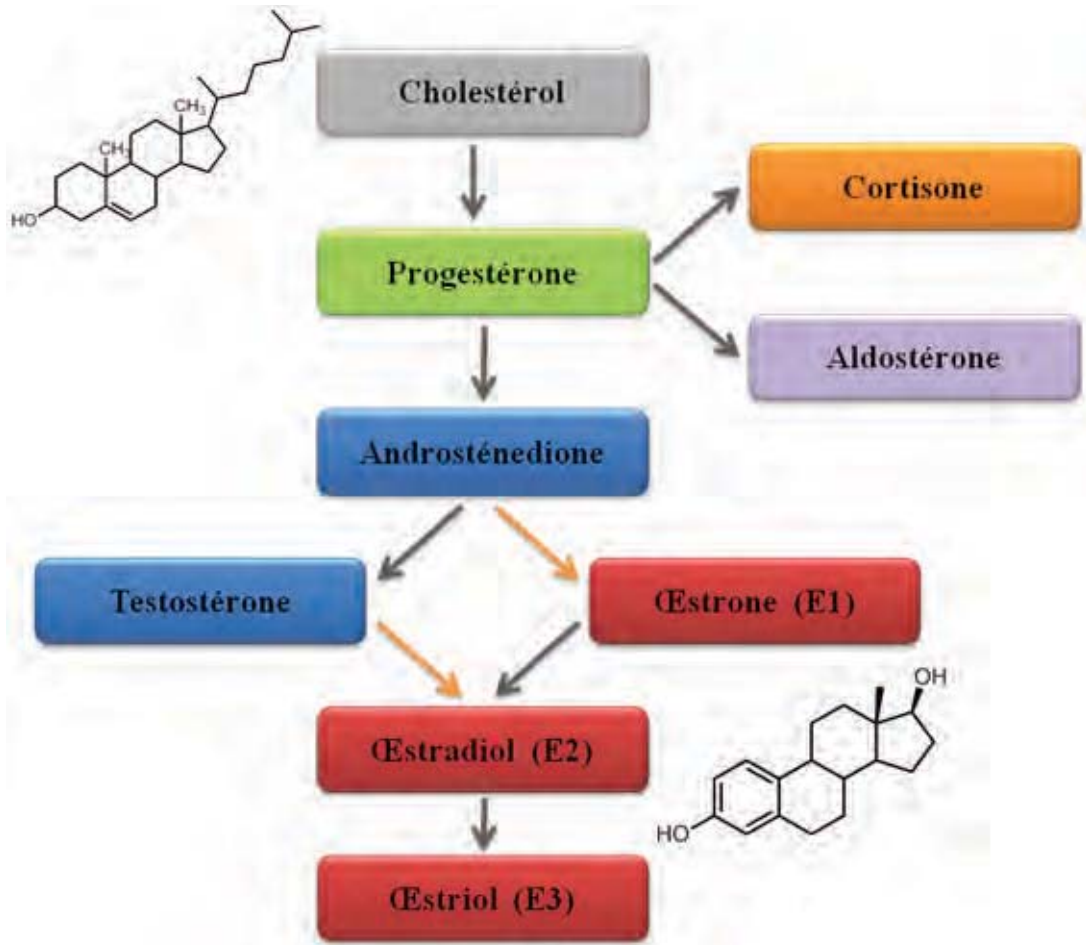
En 1993, la création de la première souris invalidée pour le gène de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ KO) a permis de faire la surprenante découverte que la vie était possible sans ce récepteur, alors connu pour être le seul médiateur des effets des œstrogènes (Lubahn *et al.*, 1993). Peu de temps après, le récepteur ER $\beta$  fut découvert, suggérant sa capacité à se substituer à ER $\alpha$ . Les observations résultant des souris ER $\alpha$ KO, ER $\beta$ KO et ER $\alpha$ ER $\beta$ KO ont permis une meilleure compréhension de l'impact physiologique des œstrogènes via leurs récepteurs.

## 1.2. RÔLES DES ŒSTROGÈNES DANS LES GRANDS SYSTÈMES PHYSIOLOGIQUES

### 1.2.1. SYNTHÈSE DES ŒSTROGÈNES

Chez l'homme comme chez la femme, les hormones stéroïdiennes dérivent de la conversion du cholestérol en progestagènes, androgènes et œstrogènes par différentes enzymes des cytochromes P450 et aromatasés (figure 2). La synthèse des œstrogènes, 17 $\beta$ -œstradiol (E2) et œstrone (E1), a principalement lieu dans les ovaires au niveau du follicule et du corps jaune chez les femmes. Les deux autres hormones œstrogéniques sont synthétisées dans des conditions physiologiques particulières. L'œstriole (E3) n'est synthétisé qu'au cours de la grossesse, tandis que l'œstetrole (E4) est fabriqué par les cellules du foie de fœtus. De par leur faible niveau de sécrétion et leur faible affinité pour les récepteurs des œstrogènes (ERs), l'œstrone, l'œstriole et l'œstetrole sont considérées comme secondaires par rapport au 17 $\beta$ -œstradiol (Havelock *et al.*, 2004).





*Figure 2 : Biosynthèse simplifiée des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol*

Les œstrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol. Par la suite, ils dérivent de l'aromatation de l'androsténone ou de la testostérone. Les hormones de la famille des progestagènes sont représentées en vert, les glucocorticoïdes en orange, les minéralocorticoïdes en violet, les androgènes en bleu et les œstrogènes en rouge. Les flèches oranges représentent les réactions catalysées par des aromatasés. Les structures du cholestérol (en haut) et de l'œstradiol (en bas) sont représentées.

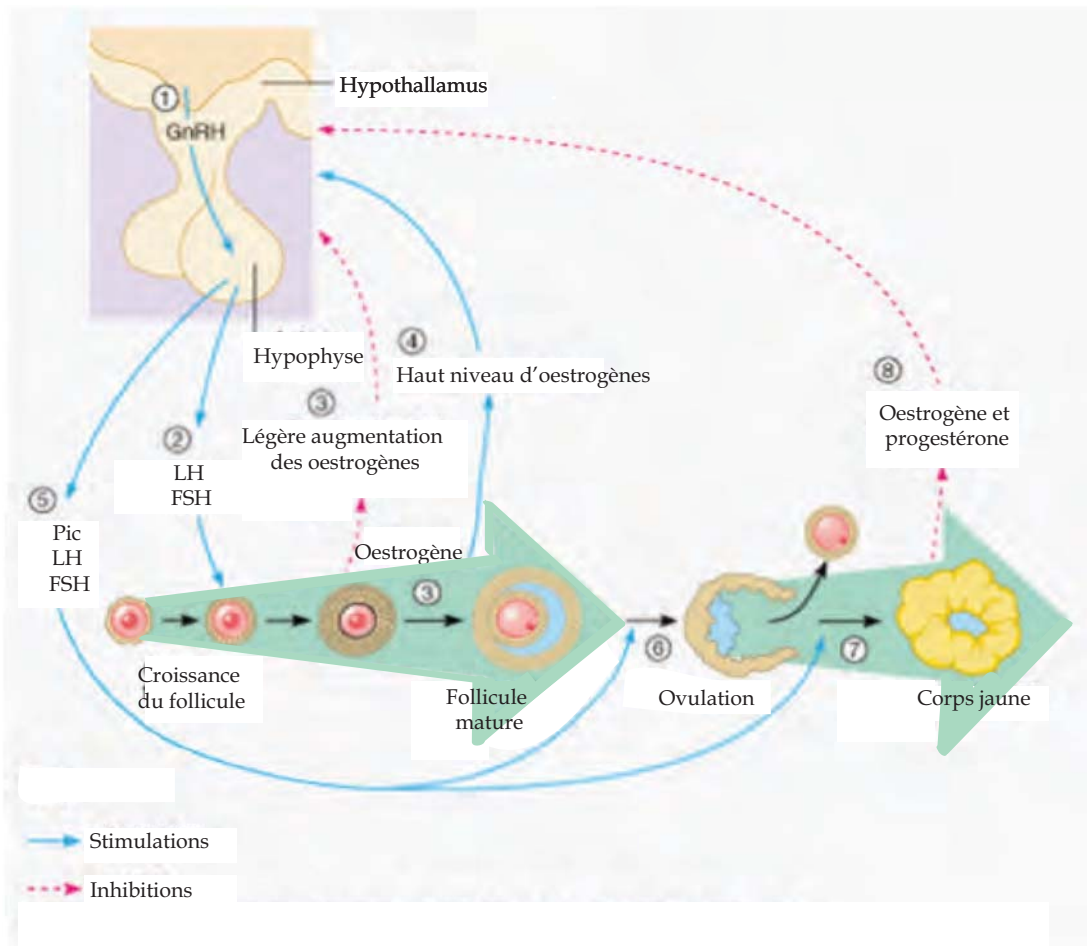
La production des œstrogènes par les ovaires est contrôlée par les hormones hypophysaires LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) (figure 3). La LH va augmenter la synthèse des œstrogènes à partir du cholestérol, lors de la phase lutéale du cycle ovarien, via la stimulation de l'expression des enzymes responsables de la conversion du cholestérol en progestérone et androsténone. Par ailleurs, la FSH agit sur les cellules folliculaires granulaires, en y augmentant l'aromatase des androgènes en œstrogènes (Poutanen *et al.*, 1995; Simpson *et al.*, 2000). Par contre, après la ménopause, les ovaires cessent la production d'œstrogènes qui agissent alors comme des facteurs autocrines ou paracrines. Les niveaux d'œstrogènes circulants deviennent minimes, tandis que les quantités d'œstrogènes locaux peuvent être élevées (Simpson, 2003). Les œstrogènes sont alors produits par les cellules mésenchymateuses des tissus gras, les cellules mammaires, les ostéoblastes et les cellules endothéliales (Clarke, 2000). La principale hormone ostrogénique devient l'œstrone (E1).

Chez les hommes, une faible production d'œstrogènes est assurée par l'aromatase périphérique des androgènes surrénaliens et testiculaires (Gooren *et al.*, 2003).

Suite à leur synthèse, les œstrogènes vont rejoindre leurs organes cibles pour y exercer leurs effets.

### 1.2.2. DISTRIBUTION DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES AU SEIN DE LEURS TISSUS CIBLES

Une fois synthétisées, les œstrogènes fonctionnent comme des hormones systémiques. Elles sont libérées dans la circulation sanguine pour atteindre leurs tissus cibles, tissus exprimant les récepteurs des œstrogènes. Les récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont exprimés en quantité variable au niveau des glandes mammaires, des os, de l'utérus, des poumons, des testicules, de la prostate, de l'épididyme et des organes des systèmes nerveux et cardiaque (Couse *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2001). Les ovaires, le foie, les reins et l'hypophyse, ne contiennent que le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  (Couse *et al.*, 1999). Au niveau de la glande



**Figure 3 : Contrôle de la production des œstrogènes au cours du cycle ovarien par l'axe hypothalamo-hypophysaire.**

La sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, stimule la libération de LH et FSH par l'hypophyse. Suivant les phases du cycle ovarien, la LH et la FSH vont stimuler la production d'œstrogènes qui, en retour, vont exercer un rétro-contrôle positif ou négatif sur la production des hormones hypothalamo-hypophysaires.

Les flèches bleues représentent une stimulation, tandis que les flèches rouges pointillées représentent une inhibition.

Adaptée de Cummings B., 2001

mammaire, les récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  sont plutôt exprimés au niveau des cellules épithéliales luminales, tandis que les récepteurs ER $\beta$ , moins localisés, se retrouvent dans les cellules épithéliales et stromales (Krege *et al.*, 1998; Palmieri *et al.*, 2002; Palmieri *et al.*, 2004).

La grande distribution des récepteurs des œstrogènes au niveau des différents organes présage de leurs rôles dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, chez la femme, les œstrogènes sont impliqués dans le développement des caractères sexuels et la reproduction, le maintien de la densité osseuse, la neuroprotection ainsi que la protection contre les maladies cardio-vasculaires (figure 4).

### 1.2.3. ŒSTROGÈNES ET SYSTÈME REPRODUCTEUR

#### ŒSTROGÈNES ET DÉVELOPPEMENT DU TRACTUS REPRODUCTEUR FÉMININ

Les œstrogènes jouent un rôle prépondérant dans le système reproducteur féminin. Bien qu'elles soient cruciales pour la détermination des caractères sexuels féminins, elles ne semblent pas indispensables à la différenciation du tractus reproducteur (Krege *et al.*, 1998; Lubahn *et al.*, 1993). En effet les souris ERKO ne répondant pas aux œstrogènes présentent un utérus hypoplasique malgré un développement normal. De même, leurs ovaires semblent normaux jusqu'à la puberté, puis deviennent hémorragiques et anovulaires (Curtis *et al.*, 2000; Lubahn *et al.*, 1993). Par contre, les souris ArKO (dont le gène des aromatasés a été inactivé), n'exprimant pas les aromatasés et ne produisant ainsi aucun œstrogènes sont plus sévèrement touchées : leurs organes génitaux externes et leur utérus sont sous-développés. Néanmoins, la sévérité du phénotype serait non seulement dû à l'absence d'œstrogènes mais aussi à des niveaux plus élevés d'androgènes (Fisher *et al.*, 1998).

De façon similaire, les œstrogènes ne semblent pas influencer le développement fœtal des glandes mammaires, mais seulement celui se produisant après la puberté (au cours de la gestation et de la lactation) (Daniel *et al.*, 1987; Fisher *et al.*, 1998; Silberstein *et al.*, 1994). En effet, les glandes mammaires des

# Effets des Oestrogènes

## Effets Positifs

### Cerveau

Neuroprotection  
et différenciation sexuelle

### Sein

Lactation et développement  
à la puberté

### Coeur et Foie

Rôle protecteur contre  
l'hypercholestérolémie  
et les maladies  
cardiovasculaires

### Ovaires

Cycle menstruel

### Utérus

Maturation de l'utérus  
et implantation du foetus

### Vagin

Maturation du vagin

### Os

Maintien de la densité osseuse

## Effets Négatifs

### Sein

Augmentent les  
risques de cancer  
du sein

### Utérus

Augmentent les  
risques de cancer  
de l'utérus

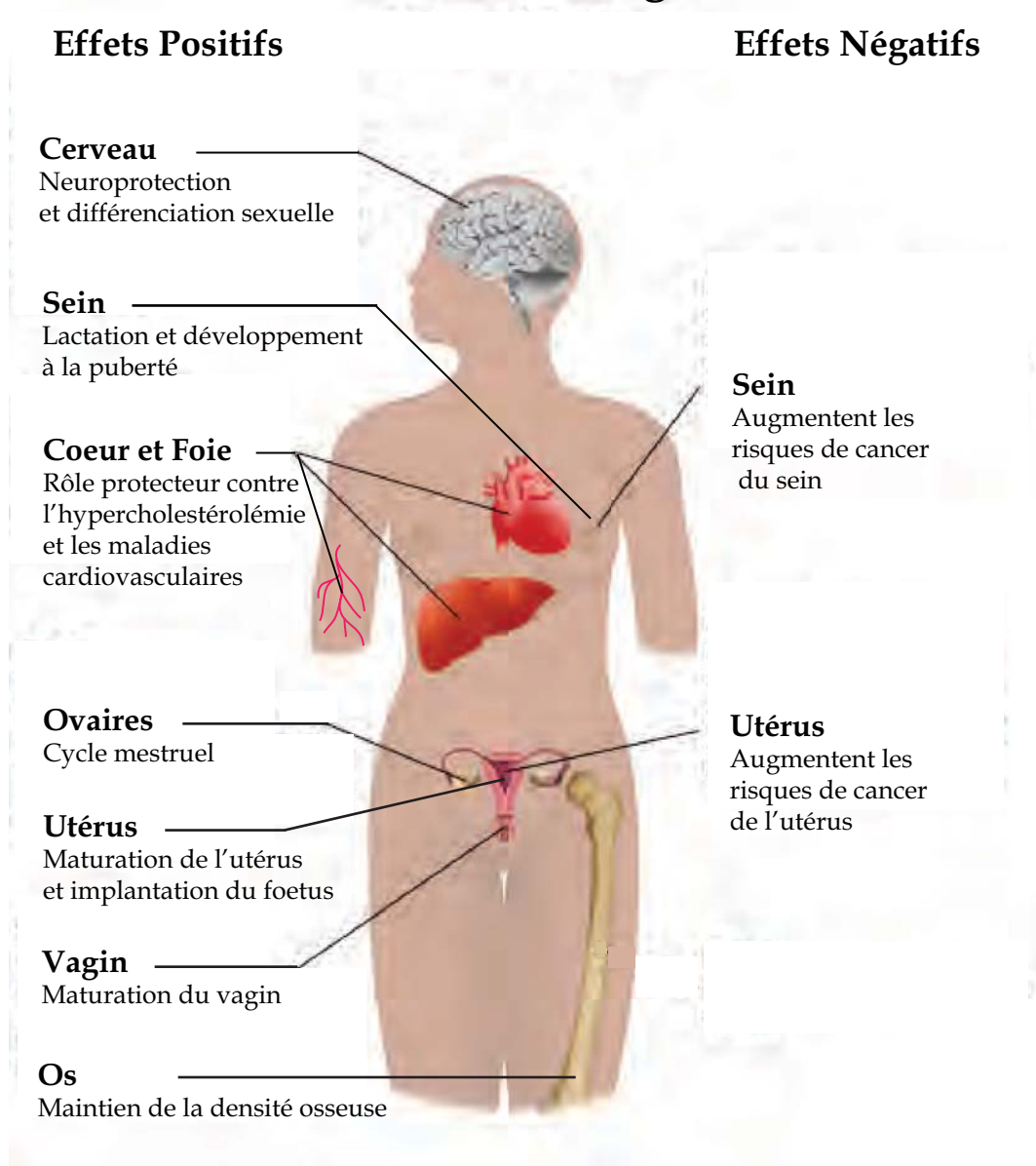


Figure 4 : Effets positifs et négatifs des œstrogènes sur leurs tissus cibles chez la femme

mammifères restent dans un état relativement indifférencié jusqu'à la production cyclique d'œstrogènes et de progestérones par les ovaires (figure 5). En absence de fonction ovarienne, le développement de la glande mammaire ne se fait pas. Néanmoins, dans ce cas, une thérapie œstrogénique de remplacement peut permettre son induction ((Laron *et al.*, 1989). A chaque cycle ovarien, les canaux galactophores de la glande mammaire se développent pour régresser par la suite. La glande mammaire ne devient fonctionnelle qu'au cours de gestation et de la lactation. A ce moment, les œstrogènes et la prolactine stimulent la croissance et la différenciation des épithéliums des canaux galactophores et alvéoles mammaires (figure 5). A la fin de la lactation, la glande mammaire involue, par l'apoptose massive des cellules, pour retrouver une simple structure ductale. L'expansion alvéolaire et leur maturation, permettant la lactation, seront ré-initiées à la prochaine grossesse.

#### ŒSTROGÈNES ET CYCLE OVARIEN

---

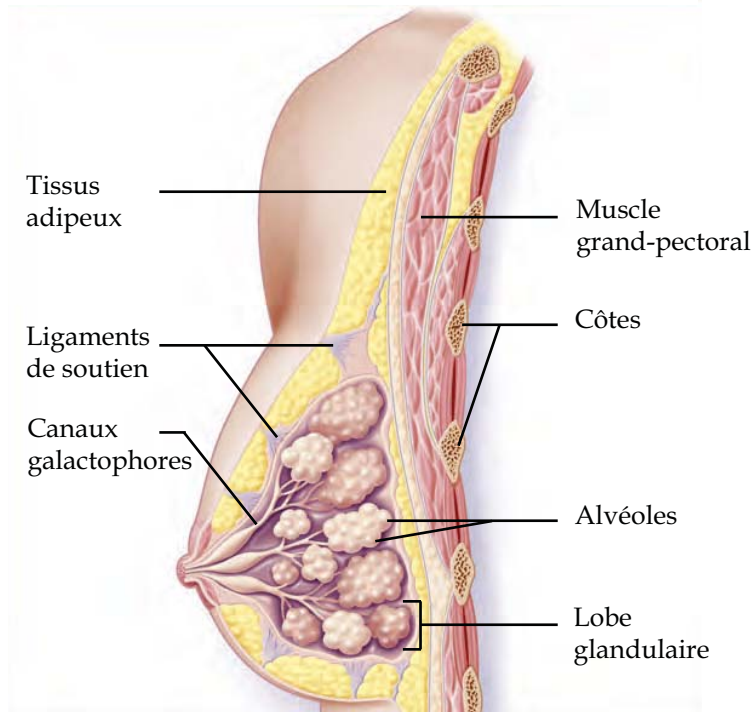
Les œstrogènes influencent les sécrétions des hormones hypophysaires FSH et LH, qui elles-mêmes contrôlent les sécrétions de stéroïdes, la gamétogenèse et l'ovulation (Nilsson *et al.*, 2001). De par cette régulation, les œstrogènes exercent une boucle de rétro-contrôle, tantôt positive, tantôt négative, sur leur propre production (figure 3). A la fin de la phase folliculaire, ils stimulent la libération de LH et FSH par l'hypophyse, sous contrôle de la GnRH (gonadolibérine ou Gonadotropin Releasing Hormone) libérée par l'hypothalamus. Les œstrogènes vont alors agir sur la maturation du follicule. A l'inverse, lors de la phase lutéale, après l'ovulation, ils vont exercer une boucle de rétrocontrôle négative et inhiber la libération des hormones hypophysaires (avec la progestérone et l'inhibine).

#### ŒSTROGÈNES ET REPRODUCTION MASCULINE

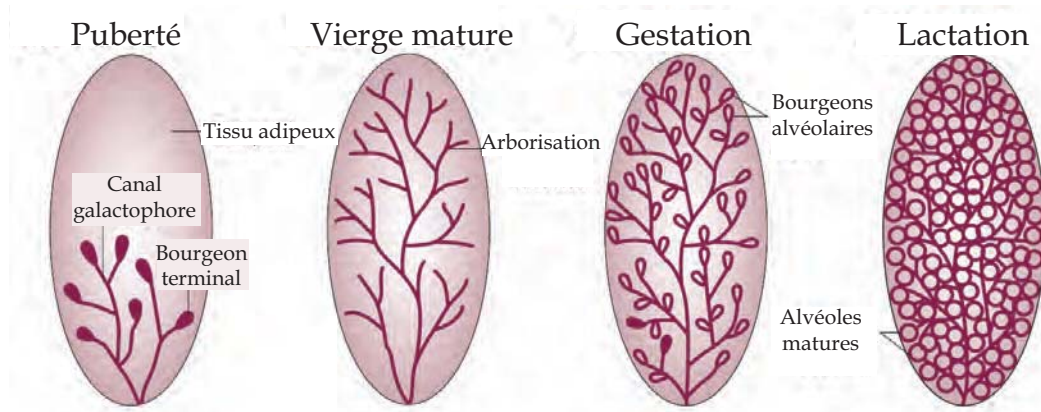
---

Les œstrogènes ne sont présents qu'à faible concentration dans la circulation vasculaire masculine et leur concentration est plus élevée dans leurs organes reproducteurs par rapport aux autres organes (Lombardi *et al.*, 2001). Néanmoins, ils

A.



B.



*Figure 5 : La glande mammaire et son développement*

A. Représentation schématique d'une coupe transversale de sein.

B. Développement de la glande mammaire de souris au cours de la puberté, la gestation et la lactation. De la naissance à la puberté, la glande mammaire présente une organisation ductale rudimentaire. Au cours de la puberté, la production ovarienne cyclique d'œstrogènes et de progestérone permet la croissance des canaux galactophores. En cas de gestation, la libération d'hormones placentaires induit la croissance et la différenciation des cellules qui donneront naissance aux alvéoles. Finalement lors de la lactation, les alvéoles deviennent complètement matures et les cellules luminales synthétisent et sécrètent le lait.

Adaptée de Hennighausen *et al.*, 2005.

jouent un rôle très important dans leur système reproducteur : des souris mâles ER $\alpha$ KO sont peu, voir non fertiles (Ciocca *et al.*, 1995; Nilsson *et al.*, 2001).

#### 1.2.4. ŒSTROGÈNES ET SYSTÈME OSSEUX

Les œstrogènes et les androgènes influencent à la fois le développement et le maintien du tissu osseux (Turner, 1999; Turner *et al.*, 1990). Ce dernier est toujours dans un état d'équilibre dynamique par un constant remodelage. L'homéostasie osseuse repose sur la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes, tandis que les ostéoclastes la résorbent. Concrètement, les œstrogènes induisent l'apoptose des ostéoclastes (Kameda *et al.*, 1997), tandis qu'ils ont l'effet inverse, anti-apoptotique, sur les ostéoblastes (Kousteni *et al.*, 2001; Termine *et al.*, 1998; Tomkinson *et al.*, 1998; Tomkinson *et al.*, 1997). Les œstrogènes sont particulièrement importants chez les femmes pour maintenir leur densité osseuse. Ceci est mis en évidence par le développement d'ostéoporose chez les femmes à la ménopause ou suite à une ovariectomie (Turner, 1999; Turner *et al.*, 1994). En effet, lors de la ménopause, de nombreuses femmes risquent d'être atteintes d'ostéoporose et de voir leur densité osseuse diminuée, leurs os se fragiliser. L'ostéoporose résulte de la rupture de l'équilibre entre synthèse et résorption par les ostéoblastes et ostéoclastes et peut être prévenu par l'administration d'œstrogènes exogènes.

#### 1.2.5. ŒSTROGÈNES ET SYSTÈME NERVEUX

La vaste distribution des sites de fixation des œstrogènes au niveau du système nerveux central (cortex, hypothalamus, amygdale, *etc.*) met en valeur leur implication dans de nombreux processus nerveux (Couse *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2006). Ils seraient, par exemple, impliqués dans les processus mnésiques et la différenciation du système nerveux entre les sexes (Couse *et al.*, 1999; Nilsson *et al.*, 2001). Les œstrogènes auraient également des fonctions neuro-protectrices face à des pathologies telles qu'Alzheimer et de Parkinson (Li *et al.*, 2005). Des études sur des cellules en culture ou des modèles animaux mettent en



avant l'impact des œstrogènes sur la synaptogénèse, la protection contre l'apoptose et l'inflammation (Currie *et al.*, 2004; Garcia-Segura *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2003; Jaffe *et al.*, 1994; Leranth *et al.*, 2000; Luine, 1985; Paganini-Hill *et al.*, 1996; Wise, 2003; Woolley *et al.*, 1992).

### 1.2.6. ŒSTROGÈNES ET SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE

L'augmentation des maladies cardio-vasculaires de façon concomitante avec la chute du taux d'œstrogènes circulant à la ménopause laisse entrevoir une implication possible de ces derniers comme agents protecteurs dans les maladies cardio-vasculaires (Guzzo, 2000). Cependant le rôle protecteur des œstrogènes contre ces pathologies ne fait pas l'unanimité. Certaines études tendent à démontrer que les femmes ménopausées à haut risque de maladies cardiovasculaires qui bénéficient d'un traitement hormonal œstrogénique ont des dommages réduits suite aux attaques cardiovasculaires par rapport à celles non traitées (Douglas *et al.*, 1998; Farhat *et al.*, 1993; McHugh *et al.*, 1995; Node *et al.*, 1997). Par contre, d'autres études indiquent que les femmes ménopausées ne présentent aucun bénéfice cardiovasculaire en réponse à des traitements avec œstrogènes et progestines. Le rôle vasodilatateur des œstrogènes est néanmoins clairement démontré (Kuiper *et al.*, 1998; Rosano *et al.*, 2001); ils régulent les molécules telles que le NO (oxyde nitrique) ou l'endothéline-1, et le récepteur de l'angiotensine II AT1 (Nickenig *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 2001). Les œstrogènes jouent également un rôle protecteur contre l'hypercholestérolémie en augmentant le rapport HDL/LDL, effet contrecarré par les anti-œstrogènes (Kuiper *et al.*, 1998; Nathan *et al.*, 1997; Nilsson *et al.*, 2001).

### 1.3. ŒSTROGÈNES ET CANCERS

A l'inverse des rôles protecteurs des œstrogènes contre l'ostéoporose ou les maladies neurodégénératives, les œstrogènes sont impliqués dans le développement de certains cancers, tels que le cancer du sein, de l'endomètre, de l'ovaire ou encore de la prostate. Par exemple, une exposition prolongée aux œstrogènes augmente le risque de cancer du sein, tandis que les glandes mammaires des souris ER $\alpha$ KO sont résistantes à la transformation par transduction d'oncogènes (Bocchinfuso *et al.*, 1997).

## 2. CANCER DU SEIN ET ŒSTROGÈNES

*« Au Canada et partout dans le monde, le cancer du sein est un enjeu de taille en santé publique. Quelle que soit la façon de l'évaluer, il s'agit d'un phénomène répandu, qui représente une cause importante de décès prématuré chez la femme.*

*Comme les chances de survie associées au cancer du sein sont bonnes, de nombreuses femmes vivent longtemps après avoir reçu un tel diagnostic. Cet état de choses a des répercussions sur l'utilisation de ressources et les questions liées à la survie, notamment les cas de récurrence, les effets à long terme des traitements et les conséquences pour la famille. À cela s'ajoutent les sommes considérables investies chaque année dans les programmes de dépistage par la mammographie, visant à détecter les cancers du sein à un stade précoce. »*

*(Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007)*

### 2.1. ÉPIDÉMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN AU CANADA

Le cancer du sein est une des priorités de la communauté scientifique et médicale. En effet, il représente le cancer le plus fréquent et la seconde cause de mortalité par cancer chez la femme au Canada (Tableau I) (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010). Le cancer du sein représente 27,6% de tous les cancers et 14,6% de la mortalité par cancer chez les femmes canadiennes. En 2010, les estimations indiquent que 23 200 nouveaux cas devraient être diagnostiqués, tandis que 5 400 décès sont attendus. A une échelle plus humaine, cela signifie qu'au cours de sa vie, 1 femme sur 9 sera atteinte d'un cancer du sein et 1 sur 28 mourra des suites de la maladie.

Tandis que l'incidence ne cesse d'augmenter, la mortalité due au cancer du sein chez la femme diminue constamment depuis le milieu des années 1980 (figure 6) (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010). Ces tendances sont attribuables au dépistage précoce par mammographie, mais aussi à une meilleure

***Tableau I : Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein au Canada en 2010 (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010)***

	<b>Femmes</b>	<b>Hommes</b>
<b>Nombre de nouveaux cas</b>	23200	180
<b>% de tous les cancers</b>	27,6%	-
<b>Rang pour l'incidence</b>	1	-
<b>Nombre de décès</b>	5300	50
<b>% de décès par cancer</b>	14,8%	0,1%
<b>Rang pour la mortalité par cancer</b>	2	-
<b>Survie relative à 5 ans</b>	87%	84%

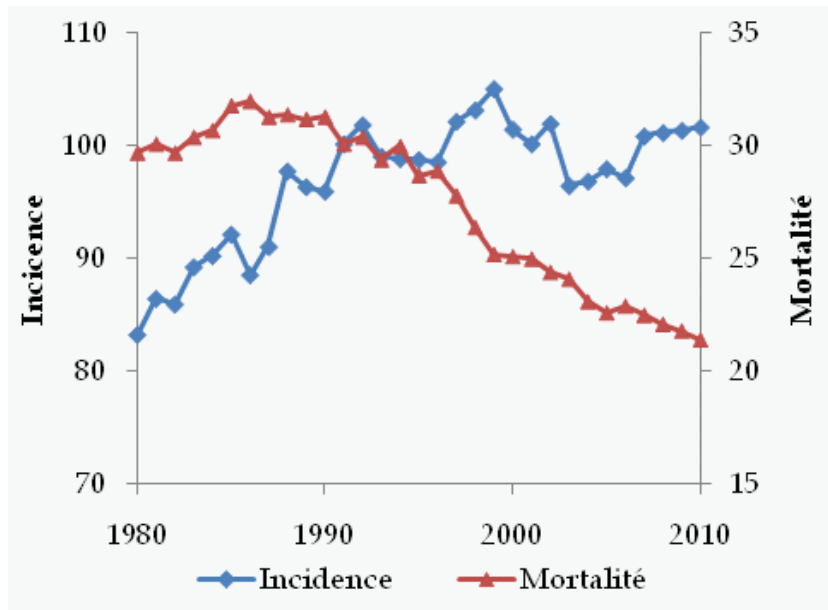


Figure 6 : Évolution des taux d'incidence et de mortalité par cancer du sein au Canada entre 1980 et 2010  
(Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010)

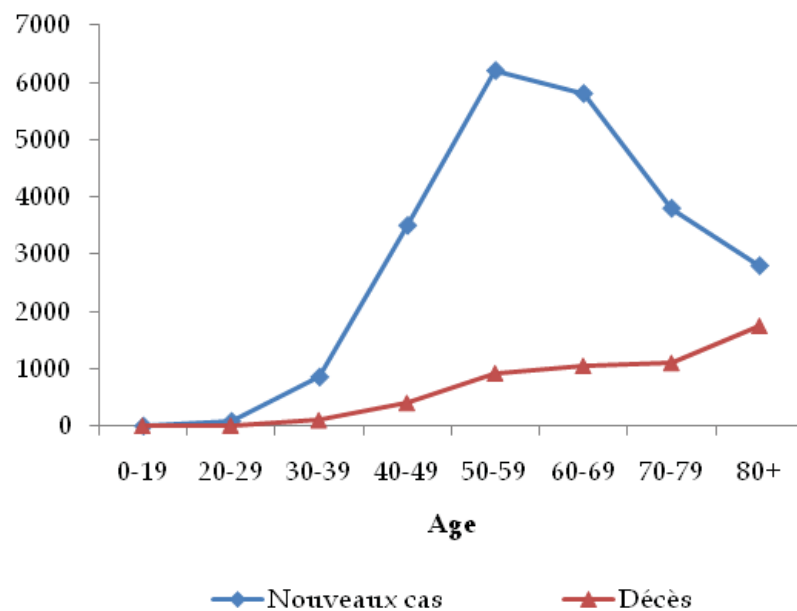


Figure 7 : Estimation du nombre de nouveaux cas et de décès par cancer du sein selon les groupes d'âge des femmes canadiennes en 2010  
(Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010)

efficacité des traitements adjuvants administrés en complément du traitement chirurgical.

N'oublions pas que les hommes peuvent également être touchés par le cancer du sein, bien que cela soit rare et représente moins de 1% des cas de cancer du sein. En effet, en 2010 les statistiques canadiennes estiment à 180 le nombre d'hommes qui seront atteint de cancer du sein et 50 qui mourront des suites de la maladie (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010).

## 2.2. FACTEURS DE RISQUE DU CANCER DU SEIN

Des antécédents familiaux ou la survenue d'un premier cancer du sein font partie des facteurs génétiques influençant le risque relatif de développer ce type de cancer. En effet, une femme ayant un proche relié au 1<sup>er</sup> degré atteint de cancer du sein voit son propre risque de développer la maladie multiplié par un facteur 1,2 à 3 (Hulka, 1996). Il existe également une forme de cancer du sein dit héréditaire, puisqu'il résulte de la mutation des gènes BRCA dans 80 à 90% des cas (de Jong *et al.*, 2002). Le gène BRCA1 est un suppresseur de tumeur, tandis que BRCA2 code pour une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN. Ce type de cancer touche de jeunes femmes qui présentent alors un cancer du sein bilatéral avec de nombreux foyers.

A l'inverse, l'incidence des cancers du sein sporadique augmente grandement avec l'âge pour diminuer ensuite, avec un pic entre 50 et 59 ans. (figure 7) (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010). Par exemple, l'incidence du cancer du sein avant 25 ans est de 1/10 000, tandis qu'à 45 ans, elle augmente d'un facteur 100 (Hulka *et al.*, 2001). Par contre, la mortalité liée au cancer du sein sporadique augmente graduellement avec l'âge.

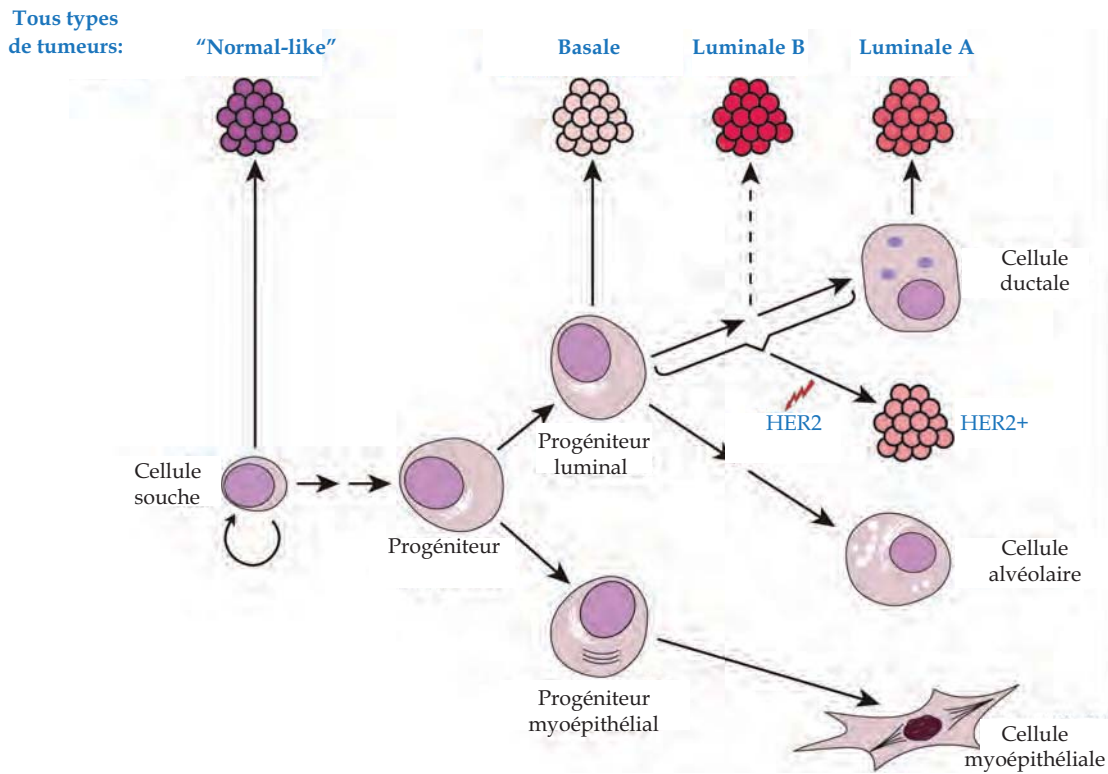
Le mode de vie et les facteurs démographiques modulent également le risque relatif de développer un cancer du sein (Parkin, 2004). Ainsi, les femmes vivant en milieu urbain, de classe socio-économique supérieure et nées en Amérique ou en

Europe du nord ont un risque de développer un cancer du sein accru (Parkin *et al.*, 1999; Robert *et al.*, 2004). Ceci est illustré par l'augmentation du risque de développer un cancer du sein chez les femmes émigrant d'Asie (où le risque de cancer du sein est faible) vers l'Amérique du nord (qui présente un fort risque de cancer du sein) 10 ans après leur établissement (Ziegler *et al.*, 1993). Ceci peut s'expliquer en partie de part la modification des habitudes alimentaires, qui peuvent également constituer un facteur de risque. Par exemple, la consommation de viandes ainsi que celle d'alcool présentent une association positive avec l'augmentation du risque de développer un cancer du sein (Willett *et al.*, 1987; Zheng *et al.*, 1998).

Les facteurs hormonaux influencent aussi grandement le risque qu'une femme soit atteinte d'un cancer du sein. De ce fait, l'obésité, l'absence de grossesse, une première grossesse après 35 ans (MacMahon *et al.*, 1973), la survenue précoce des menstruations (MacMahon *et al.*, 1973) ou une ménopause tardive (Trichopoulos *et al.*, 1972) constituent des facteurs de risque. En fait le temps d'exposition aux œstrogènes est associé au risque de développer un cancer du sein (Josephy, 1997), tout comme la prise d'œstrogènes exogènes sous forme de contraceptif ou d'hormonothérapie de remplacement (Key *et al.*, 1984). Ceci peut être mis en relation avec les propriétés mitotiques des œstrogènes sur les cellules épithéliales mammaires, qui du fait de leur fort niveau de prolifération deviennent plus sensibles à la transformation par des carcinogènes (Russo *et al.*, 2000).

### 2.3. CLASSIFICATION DES TUMEURS MAMMAIRES

L'impact des différents facteurs de risque se retrouve dans la classification des cancers du sein, par exemple ils sont fréquemment séparés en fonction du statut des récepteurs hormonaux ER et PR (récepteur de la progestérone). Ils sont regroupés en fonction de critères cliniques tels que l'histologie ou encore l'invasion des ganglions. Plus récemment, l'étude des profils d'expression de plusieurs centaines de tumeurs mammaires ont permis d'affiner leur classification en cinq sous-types : « normal-



*Figure 8 : Relation possible entre le modèle de développement hiérarchique des cellules épithéliales de la glande mammaire et les différents sous-types de tumeurs mammaires*

Les 5 sous-types de tumeurs : «normal-like», basale, luminale A, luminale B et HER2+ sont représentés en lien avec les cellules épithéliales ayant les signatures moléculaires les plus proches, d'après l'analyse de leurs profils d'expression.

(Adaptée de Visvader J.E., 2010)



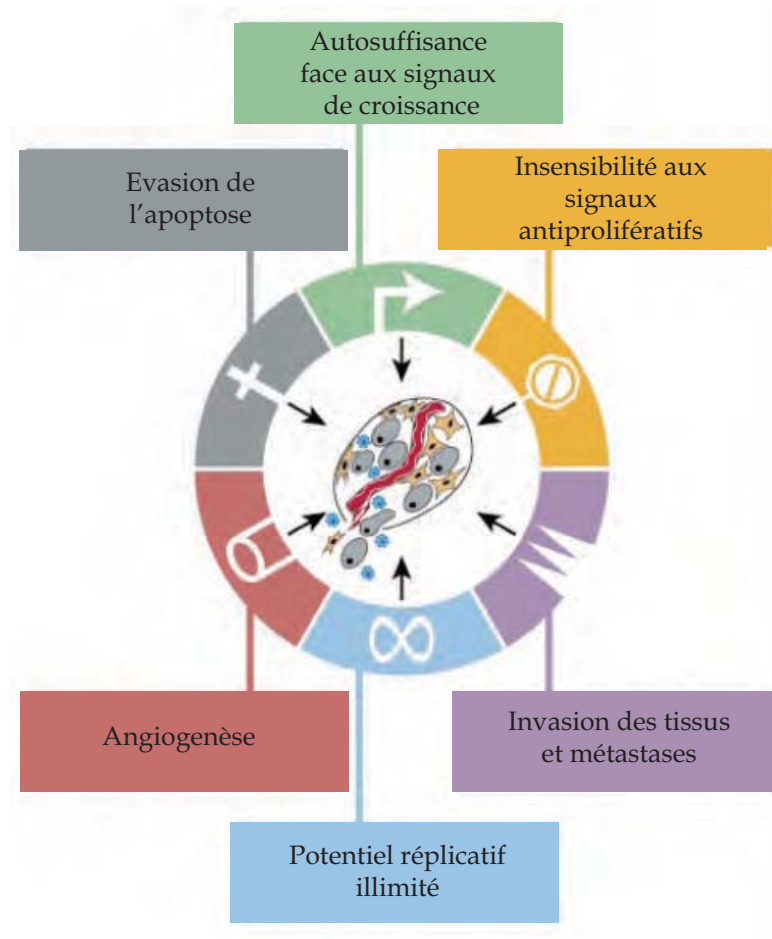
like », HER2+ (Human Epidermal growth factor Receptor 2), basale, luminale A et B (figure 8) (Sorlie *et al.*, 2001; van 't Veer *et al.*, 2002). Ces derniers sont en lien avec le type de cellule mammaire ayant subi une transformation et donné naissance à la tumeur.

Le fait que 70% des cancers du sein soient ER $\alpha$ + (croissance dépendante des œstrogènes) semblerait indiquer que la majorité des tumeurs dérive de transformation de cellules de la lignée luminale, sans pour autant exclure la possibilité que des cellules ER $\alpha$ - se différencient en cellules ER $\alpha$ + (Visvader, 2009).

#### 2.4. RÔLE DES ŒSTROGÈNES DANS LA CARCINOGENÈSE MAMMAIRE

L'impact des œstrogènes dans le développement du cancer du sein est soutenu par l'association de la durée d'exposition aux œstrogènes et le risque de développer un cancer du sein (Joseph, 1997). De plus, les traitements anti-œstrogénique réduisent l'incidence des cancers du sein chez les femmes à haut risque (Fisher *et al.*, 1998). Finalement, l'impact des œstrogènes sur la carcinogenèse mammaire a été confirmé par les souris ER $\alpha$ KO. Les glandes mammaires de ces dernières sont résistantes à la transformation par transduction d'oncogènes (Anderson, 2002; Bocchinfuso *et al.*, 1997).

Les œstrogènes et leur récepteur ER $\alpha$  stimulent la prolifération des cellules via la modulation de l'expression et de l'activité de régulateurs clés du cycle cellulaire tels que les kinases cycline-dépendantes, cycline D1, c-Myc ou encore pRb (Cariou *et al.*, 2000; Carroll *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2005; Watts *et al.*, 1995). Ils augmenteraient également l'apparition de mutations somatiques lors de la réplication de l'ADN. Lorsque ces mutations ont lieu dans des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose ou l'angiogenèse et apportent un avantage sélectif aux cellules, le processus tumoral est enclenché (Hahn



*Figure 9 : Processus cellulaires impliqués dans la tumorigenèse.*

Au cours du temps et du processus tumoral, les cellules cancéreuses acquièrent différents avantages sélectifs leur permettant :

- (1) indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération cellulaire,
- (2) insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance cellulaire,
- (3) évasion du processus apoptotique,
- (4) capacité proliférative illimitée,
- (5) induction de l'angiogenèse,
- (6) acquisition de capacité invasive et métastatique.

Adaptée de Hanahan *et al.*, 2000.

(Hahn *et al.*, 2002; Hanahan *et al.*, 2000) (figure 9). De plus, les métabolites des œstrogènes pourraient également avoir un effet génotoxique (Cavalieri *et al.*, 1997).

Le récepteur des œstrogènes ER $\beta$  a été identifié plus de 30 ans après ER $\alpha$  (Kuiper *et al.*, 1996), ainsi, ses activités et son implication dans le cancer du sein sont moins bien établis. Néanmoins, ER $\beta$  semble agir comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  dans le cancer du sein (Faulds *et al.*, 2004; Green *et al.*, 2007; Lindberg *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Strom *et al.*, 2004). Par exemple, lorsqu'il est surexprimé dans des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives MCF-7, ER $\beta$  inhibe la transcription de gènes cibles endogènes des œstrogènes en liant leur promoteur de manière répressive, comme les gènes de la cycline D1, de CDC25A ou encore BIRC5 (Chang *et al.*, 2006; Matthews *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2005)

La découverte de l'impact des œstrogènes (via ER $\alpha$ ) sur le développement des cancers du sein a fortement influencée le traitement de ces derniers au cours des 40 dernières années.

## 2.5. LE CANCER DU SEIN ET SES TRAITEMENTS À TRAVERS L'HISTOIRE

### 2.5.1. DE L'ÉGYPTE ANCIENNE AU XXIÈME SIÈCLE

#### LE TEMPS DE LA CHIRURGIE

L'histoire du cancer du sein commence très tôt. Dès l'Égypte ancienne, les tumeurs mammaires sont décrites et traitée par chirurgie et cautérisation (figure 10).



Extrait du papyrus signifiant : « Instructions concernant les tumeurs des seins ». (Breasted, 1930)

L'invasion des ganglions lymphatiques est même prise en compte depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle avec Le Dran, qui préconise de les ôter en même temps que la tumeur (Oliveira *et al.*, 2007). Plus le temps passe, plus les mastectomies s'élargissent s'appuyant sur des données microscopiques mettant en évidence, notamment, l'invasion du muscle pectoral par la tumeur (figure 11). Ces chirurgies très agressives ont néanmoins permis de diminuer le taux de récurrence locale de 82% à 6% au cours du XX<sup>ème</sup> siècle (Bronagh *et al.*, 1997). Le développement de la mammographie, mettant en évidence de plus petites tumeurs, a fait naître des doutes quant aux avantages de telles chirurgies. Ainsi, entre les années 1950 et 1970, la tendance s'est inversée avec des mastectomies de plus en plus limitée avec des taux de survie similaires (Patey *et al.*, 1948; Williams *et al.*, 1953).

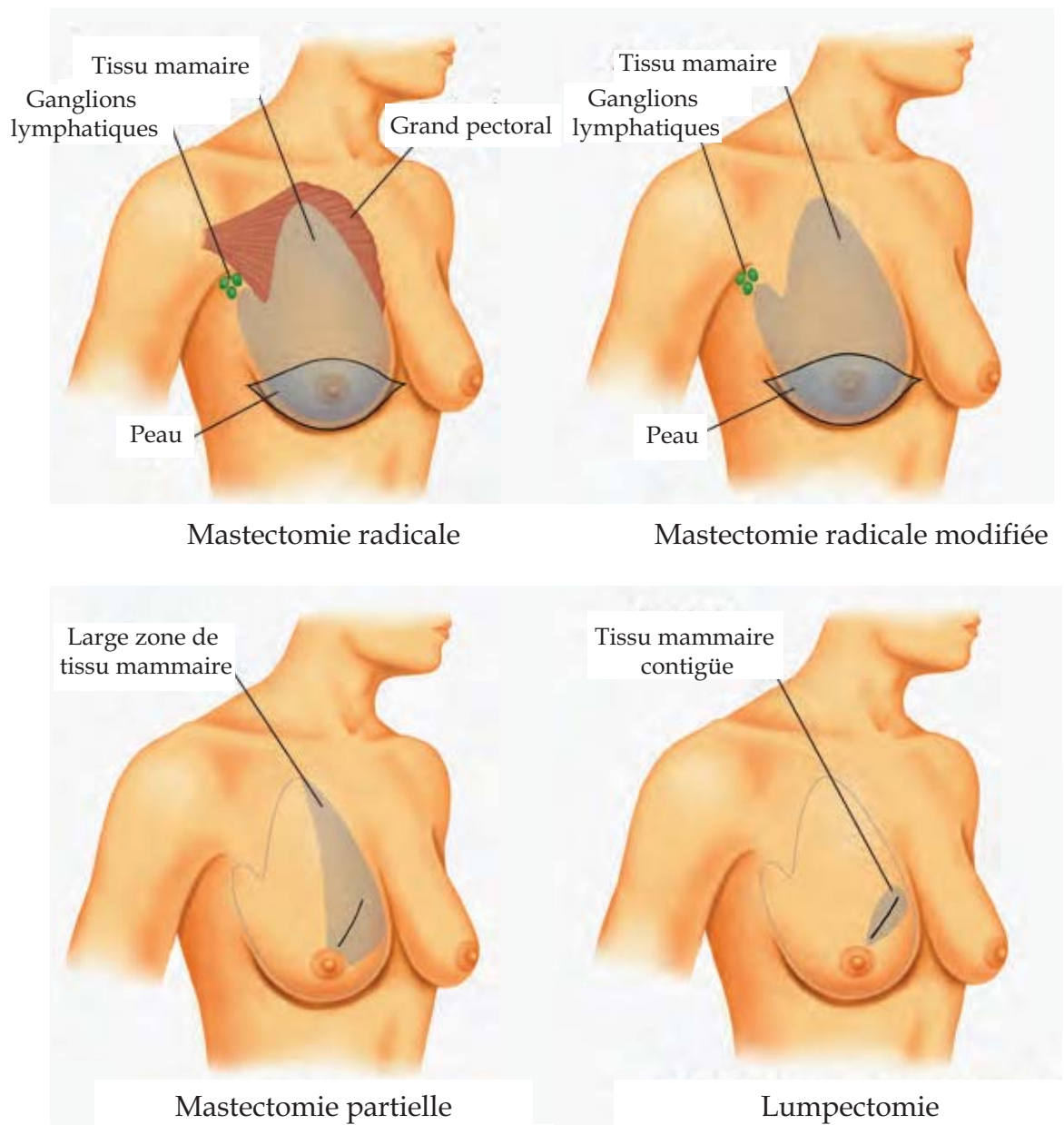
#### LA NAISSANCE DES TRAITEMENTS ADJUVANTS

---

Dans les années 1970, les progrès de la radiothérapie ont permis le traitement adjuvant des patientes opérées, augmentant ainsi le temps de survie sans rechute (Fisher *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 1985). Par la suite, les progrès en terme de mammographie, liés à l'essor de l'histopathologie et de l'imagerie ont permis la détection plus précoce des tumeurs, leur classification en fonction de leurs réponses aux traitements et ainsi qu'une réduction du nombre de mastectomies par rapport à la chirurgie conservatrice.

#### 2.5.2. TRAITEMENTS DES CANCERS DU SEIN DE NOS JOURS

Encore aujourd'hui, le traitement des cancers du sein repose principalement sur l'ablation des tumeurs. De plus, suivant les cas, des traitements adjuvants sont administrés pour réduire la taille des tumeurs, préalablement à la chirurgie, ou après cette dernière, afin de réduire le risque de rechute. Les traitements adjuvants actuels comprennent la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Dans chaque cas, le bénéfice potentiel d'un tel traitement est mis en balance avec le risque de complications. En effet, ces thérapies ont des effets secondaires forts à court et à long



*Figure 11 : De la mastectomie étendue à la lumpectomie : évolution avec le temps*

Aujourd'hui ces différents types de mastectomie sont utilisées suivant l'étendue de la tumeur.

Adaptée de <http://cancer-studies.com/breast-cancer-surgery>

terme. Afin de les guider dans leurs choix, les médecins disposent de divers facteurs pronostics, comme la taille de la tumeur, l'invasion des ganglions lymphatiques, la présence de métastases, le grade et le type histologique des tumeurs ou encore l'expression de marqueurs, tels que les récepteurs des œstrogènes ou de la progestérone.

#### CHIRURGIES ACTUELLES

---

Trois types de chirurgie sont actuellement réalisés : la tumorectomie, la segmentectomie (ablation d'une partie du sein) et la mastectomie (figure 11). En même temps, la présence de cellules tumorales au niveau du ganglion sentinelle est recherchée. Cette nouvelle technique permet d'éviter à de nombreuses femmes un curage axillaire (retrait de la quasi-totalité des ganglions de la région) en cas de résultat négatif.

#### RADIOTHÉRAPIE

---

La radiothérapie est toujours réalisée dans le cas de chirurgie conservatrice pour réduire le risque de récurrence locale. L'irradiation des chaînes ganglionnaires est également pratiquée au besoin.

#### CHIMIOTHÉRAPIE

---

La chimiothérapie adjuvante permet également une baisse de la mortalité et du taux de récurrence. Pour les patientes présentant une atteinte ganglionnaire, le protocole de référence se compose de trois cycles de chimiothérapie. Pour les autres patientes, les facteurs pronostics sont recherchés afin de déterminer la balance bénéfique/risque. Les principaux effets secondaires de ces thérapies (fatigue, nausées et vomissement, chutes des cheveux) sont de mieux en mieux contrôlés, mais restent très délétères.

## ANTICORPS MONOCLONAUX

---

L'arrivée de l'Herceptin<sup>®</sup> sur le marché canadien, en 1999, a grandement modifié la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+. Ces cancers représentent 20% à 25% des cancers du sein et avaient, jusque-là, un mauvais pronostic. L'Herceptin<sup>®</sup> est un anticorps monoclonal permettant de bloquer le récepteur Her2 impliqué dans la prolifération accrue des cellules. Administré en thérapie adjuvante pendant un an, il permet d'augmenter grandement le temps de survie des patientes et de diminuer de moitié le risque de rechute (Romond *et al.*, 2005). Il existe également un anticorps monoclonal dirigé contre VEGF : l'Avastin<sup>®</sup>.

## HORMONOTHÉRAPIE

---

Les 2/3 des tumeurs mammaires expriment le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ . La croissance de ces tumeurs, dites ER $\alpha$ -positives, dépend alors des œstrogènes. Les traitements hormonaux ont pour but de bloquer cette prolifération des cellules œstrogène-dépendantes : (i) en diminuant le taux d'œstrogène circulant (suppression ovarienne ou anti-aromatases) ou (ii) en bloquant l'activité du récepteur ER $\alpha$  (anti-œstrogènes). L'hormonothérapie occupe une place de choix dans les traitements adjuvant de la chirurgie, mais aussi dans le traitement palliatif du cancer du sein métastatique. Elle est également utilisée dans la prévention du cancer du sein chez les femmes à haut risque.

La castration chirurgicale (ovariectomie) ou « médicale » (par des agonistes de la GnRH) permet de supprimer la production des œstrogènes par les ovaires chez les femmes non-ménopausées. Par contre, elle ne permet pas d'inhiber leur production par les tissus périphériques.

A l'inverse, les anti-aromatases utilisées aujourd'hui, tels que l'Anastrozole<sup>®</sup>, le Letrozole<sup>®</sup> ou l'Exemestane<sup>®</sup>, sont très spécifiques et permettent une inhibition très efficace de la synthèse des œstrogènes d'origine périphérique. Par contre, elles ne permettent pas d'inhiber la synthèse des œstrogènes d'origine ovarienne. Leur utilisation est donc restreinte et ne s'adresse qu'aux patientes ménopausée ou

castrées. L'administration d'anti-aromatases permet alors une réduction du risque de rechute, mais n'augmente pas la survie des patientes. Actuellement, les inhibiteurs d'aromatases sont préférentiellement administrés aux femmes ménopausées car ils ont fait la preuve de leur supériorité en présence de métastases (Buzdar, 2002).

Enfin les anti-œstrogènes (AEs) sont des antagonistes partiels (aussi appelés SERM, selective estrogen receptor modulator) ou totaux du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ . Leur chef de file, le Tamoxifène<sup>©</sup> est administré aux femmes, ménopausées ou non, présentant un cancer du sein métastatique. Il est également prescrit pour cinq ans, en thérapie adjuvante, aux patientes présentant un cancer du sein peu avancé, afin de prévenir les rechutes et l'apparition de métastases. Le Tamoxifène<sup>©</sup> permet ainsi de réduire le risque de récurrence et celui de décès (Ali *et al.*, 2002).

## 2.6. LES ANTI-ŒSTROGÈNES COMME AGENTS ANTI-TUMORAUX

### 2.6.1. UN SIÈCLE DE TRAITEMENTS HORMONAUX : DE L'OVARIECTOMIE AUX ANTI-ŒSTROGÈNES

Les premiers traitements hormonaux du cancer du sein date du XIX<sup>ème</sup> siècle. Ils sont nés de l'observation selon laquelle une atrophie des seins est généralement observée lorsque les ovaires cessent de fonctionner (A. Schinzinger) (Halberstaeder *et al.*, 1946). L'ovariectomie a été le premier traitement hormonal utilisé en 1896 et induisait des rémissions chez des patientes (non ménopausées) souffrant de cancer du sein métastatique (George Beatson) (Boyd, 1900). Des expériences sur des souris confirmèrent l'impact des fonctions ovariennes et de leurs hormones sur le développement des cancers du sein (Ali *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 1923; Lathrop, 1916). Finalement en 1936, A. Lacassagne émet l'hypothèse selon laquelle les cancers du sein pourraient être prévenus par des traitements antagonistes des œstrogènes (Lacassagne, 1936). Les premiers anti-œstrogènes ont été développés, dans les années 1950, comme contraceptifs d'urgence, mais n'étaient que peu efficaces (Howell *et al.*, 2005). L'identification du premier récepteur des œstrogènes,



ER $\alpha$ , et sa localisation dans l'utérus, le vagin, mais aussi dans des tumeurs mammaires, menèrent à l'utilisation des anti-œstrogènes comme traitement contre le cancer du sein. MER25 fut le premier à être testé, mais il ne put être utilisé en clinique du fait de sa faible efficacité et de sa forte toxicité (Lerner, 1981; Lerner *et al.*, 1958). Au cours des années 1960-1970, les grandes avancées technologiques ont permis de comprendre le mécanisme d'action du récepteur ER $\alpha$  et de mettre en évidence le caractère anti-œstrogénique du Tamoxifène<sup>©</sup>, jusqu'alors utilisé comme contraceptif oral (Cole *et al.*, 1971; Lerner *et al.*, 1990). Il fut d'abord administré dans le cadre des cancers du sein métastatiques, permettant un recul de la maladie dans 30% des cas (Ali *et al.*, 2002). Aujourd'hui, la grande majorité des patientes atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ -positif reçoivent le Tamoxifène<sup>©</sup> en traitement adjuvant de la chirurgie (Jordan, 2003).

### 2.6.2. ANTI-ŒSTROGÈNES PARTIELS

Les anti-œstrogènes partiels ou SERM, tels que le Tamoxifène<sup>©</sup>, sont caractérisés par la dualité de leurs effets sur le récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  en fonctions des tissus (Tableau II). Ainsi, le Tamoxifène<sup>©</sup> exerce des effets antagonistes au niveau de la glande mammaire, par contre il constitue un agoniste de ER $\alpha$  dans les os et l'utérus. Si le maintien de la densité osseuse induite par le Tamoxifène<sup>©</sup> est bénéfique, ses effets agonistes au niveau de l'utérus augmentent le risque de cancer d'un facteur 3 à 4 (Anzai *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1994; Fisher *et al.*, 1994; Freedman *et al.*, 2001; Kedar *et al.*, 1994; van Leeuwen *et al.*, 1994). Néanmoins, la possibilité de la présence de micrométastases ne pouvant être éliminée, même avec un cancer du sein localisé, la grande majorité des patientes atteintes de cancers du sein ER $\alpha$ -positifs reçoivent tout de même le Tamoxifène<sup>©</sup> en traitement adjuvant de la chirurgie (Jordan, 2003). Cependant, de plus en plus de patientes reçoivent des anti-aromatases en lieu et place du Tamoxifène<sup>©</sup>.

Au milieu des années 1980, une nouvelle génération d'anti-œstrogènes partiels, structurellement différents, est née. Le Raloxifène, initialement développé

*Tableau II: Activités biologiques des ligands des récepteurs des œstrogènes dans leurs tissus cibles.*

	Glande mammaire	Utérus	Os	Système cardiovasculaire
17 $\beta$ -œstradiol	+	+	+	+
Tamoxifène	-	+	+	+
Raloxifène	-	-	+	+
ICI182.780	-	-	-	-

pour traiter l'ostéoporose (Black *et al.*, 1994; Grese *et al.*, 1997; Sato *et al.*, 1996) et ayant un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer (Du, 2004), agit comme antagoniste au niveau du sein et de l'utérus (Black *et al.*, 1994; Gottardis *et al.*, 1988). Il est pour le moment testé en essai clinique, mais ne semble pas présenter d'effets supérieurs au Tamoxifène©, ni permettre le traitement des tumeurs résistantes au Tamoxifène© (Denger *et al.*, 2001; Donaghue *et al.*, 1999). En effet, l'utilisation des anti-œstrogènes partiels est limitée par la survenue de phénomènes de résistance acquise avec le temps (Johnston, 1997; McClelland *et al.*, 2001). Par exemple, des cellules MCF-7 (lignées de cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives) maintenues sous exposition au Tamoxifène© puis implantées dans des souris athymiques, prolifèrent de manière Tamoxifène©-dépendante (Belani *et al.*, 1989; Gottardis *et al.*, 1988).

### 2.6.3. ANTI-ŒSTROGÈNES TOTAUX

Les anti-œstrogènes totaux ont été conçus à partir de la structure du 17 $\beta$ -œstradiol comme point de départ, afin de bloquer complètement ER $\alpha$ . A la fin des années 1980, le premier anti-œstrogène total est décrit : ICI164.384. Ce composé ne présente aucun effet agoniste, inhibe les effets agonistes du 17 $\beta$ -œstradiol (et du Tamoxifène©) dans l'utérus et arrête la croissance des MCF-7 en bloquant leur cycle cellulaire en phase G1 (Howell *et al.*, 2005; Wakeling *et al.*, 1987; Wakeling *et al.*, 1991). Par la suite d'autres anti-œstrogènes totaux sont développés : ICI182.780 (Fulvestrant), RU48668, RU39416, EM 139 et EM800. ICI182.780 résulte de la volonté d'augmenter la biodisponibilité et l'affinité du ICI164.384.

ICI182.780 (noté ICI) inhibe la croissance des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives MCF-7 plus efficacement que le Tamoxifène© (Hu *et al.*, 1993; Osborne, 1998). Il permet également d'inhiber la croissance œstrogène-dépendante de xénogreffes tumorales, issue de MCF-7, chez des souris athymiques, sans présenter d'effet utéro-trophique (Wakeling *et al.*, 1991) (Tableau II). D'autres études *in vivo*, avec des rats immatures ou ovariectomisées, ont démontré l'inhibition des

effets des œstrogènes ou du Tamoxifène© dans l'utérus par ICI (Howell *et al.*, 2005; Wakeling *et al.*, 1991). De la même manière, ICI bloque la croissance endométriale associée aux œstrogènes chez des primates ovariectomisées (Dukes *et al.*, 1993), ceci a également été confirmé chez des sujets sains humains (Addo *et al.*, 2002). En tant qu'antagoniste total, ICI ne présente pas les effets bénéfiques du Tamoxifène© sur la densité osseuse, et n'influencerait pas non plus le système cardiovasculaire ou cérébrale (ICI ne traverserait pas la barrière hémato-encéphalique) (Howell *et al.*, 1996; Howell *et al.*, 2000; Lundeen *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 1993) (Tableau II). Le profil des effets secondaires de ICI est similaires à celui des autres thérapies hormonales. Finalement, ICI ne présentent pas de résistance croisée avec le Tamoxifène© ou le Raloxifène (Osborne *et al.*, 1994), permettant l'utilisation séquentielle de ces anti-œstrogènes, et laissant entrevoir des mécanismes d'action différents.

ICI est actuellement utilisé pour le traitement de femmes ménopausées atteintes de tumeurs mammaires ER $\alpha$ -positives suite à une récurrence locale ou à la survenue de métastases (Piedbois *et al.*, 2009). Au préalable, 94% de ces patientes ont bénéficié d'une autre hormonothérapie, du Tamoxifène© dans 60% des cas et d'inhibiteur de l'aromatase dans 90% des cas (Piedbois *et al.*, 2009). La durée médiane du traitement est de six mois et représente la plupart du temps le dernier recours de traitement hormonal (Piedbois *et al.*, 2009).

Afin de comprendre les mécanismes d'action des anti-œstrogènes, la compréhension des mécanismes d'action des œstrogènes via leurs récepteurs est nécessaire.

### 3. LES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES COMME MÉDIATEURS DE L'ACTION DES ŒSTROGÈNES : MÉCANISMES

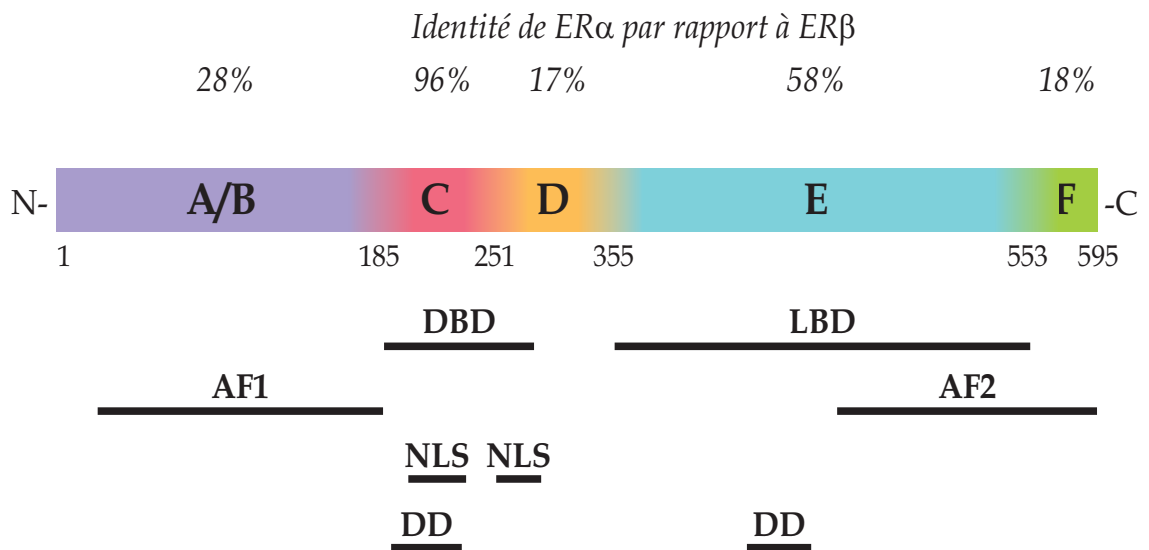
Depuis la découverte du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  dans les années 1960 (Green *et al.*, 1986), la compréhension des mécanismes d'action des œstrogènes est en constante progression. La découverte d'un second récepteur des œstrogènes ER $\beta$ , bien plus tard en 1995, a permis d'expliquer et de compléter le tableau en développant certains effets des œstrogènes qui semblaient indépendant du récepteur ER $\alpha$  (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996).

Les récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont des récepteurs stéroïdiens, tout comme les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des androgènes (AR), de la progestérone (PR) ou des minéralocorticoïdes (MR) (Tsai *et al.*, 1994). Plus globalement, ces récepteurs sont des récepteurs nucléaires : des facteurs de transcription dont l'activité est sous la dépendance d'un ligand. La famille des récepteurs nucléaires, née dans les années 1980, ne cessent de s'agrandir ; elle compte aujourd'hui plus de 300 membres. Les récepteurs nucléaires sont présents chez les métazoaires uniquement. Ils jouent un rôle primordial dans le développement embryonnaire et ont un impact sur de nombreuses fonctions physiologiques, mais aussi physiopathologiques (figure 1).

### 3.1. ORGANISATION MODULAIRE DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES : RELATION STRUCTURE/FONCTION

#### 3.1.1. DUALITÉ DE FONCTION : RÉCEPTEUR ET FACTEUR DE TRANSCRIPTION

Correspondant à leur définition de facteur de transcription ligand-dépendant, les récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire caractéristique. Elle est articulée autour de trois principaux domaines fonctionnels articulés en six régions correspondant à différents degrés de conservation entre les récepteurs nucléaires (figure 12). Les régions C et D comprennent le domaine de liaison à l'ADN (DBD), caractéristique de la famille des récepteurs nucléaires. Il représente, logiquement, la région la plus conservée entre les membres de la famille et est composé de deux doigts de zinc à quatre cystéines. Le DBD fait des récepteurs nucléaires des facteurs de transcription capables de lier des séquences spécifiques de l'ADN, tels que les éléments de réponse aux œstrogènes (EREs) dans le cas des ERs (Mader *et al.*, 1993). Les régions E/F, moins conservées, comprennent le domaine de liaison au ligand (LBD), faisant des récepteurs nucléaires des facteurs de transcription ligand dépendant (Kuiper *et al.*, 1997). Finalement, dans le cadre des récepteurs des œstrogènes, deux fonctions de transactivation leur permettent d'activer la transcription de leurs gènes cibles en réponse à la stimulation œstrogénique dans le cas présent. La fonction AF-2 est ligand-dépendante tandis que AF-1 confèrent aux récepteurs des œstrogènes des propriétés cellule- et promoteur-spécifiques. Les séquences des récepteurs des œstrogènes comportent également deux signaux de localisation nucléaire au niveau des régions D et E, ainsi que deux domaines de dimérisation situés dans les régions C et E (figure 12).



*Figure 12 : Organisation modulaire des récepteurs nucléaires :  
exemple du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$*

Les récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire en lien avec leur fonction : le DBD et les fonctions de transactivations AF leur permettent de lier l'ADN et d'agir en facteur de transcription, tandis que le LBD place leur fonction sous la dépendance de leurs ligands respectifs. Les pourcentages d'homologie de séquence entre les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont représentés.

AF1 : fonction de transactivation 1, AF2 : fonction de transactivation 2,  
DBD : domaine de liaison à l'ADN, LBD : domaine de liaison à l'ADN,

### 3.1.2. MODÈLE D'ACTION GÉNÉRAL DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Les récepteurs nucléaires hormonaux possèdent un mécanisme d'action classique (figure 13). L'hormone, ayant des propriétés hydrophobes, diffuse passivement à travers la membrane plasmique et se lie au récepteur, provoquant un changement de conformation de ce dernier. Le récepteur lié à l'hormone, en conformation agoniste, est libéré du complexe inhibiteur, dimérise et va lier l'ADN au niveau de son élément de réponse aux hormones spécifiques, en amont de ses gènes cibles. Co-activateurs de la transcription et ARN polymérase sont recrutés et permettent la transcription du gène cible. La protéine produite influencera alors le fonctionnement de la cellule en réponse à la stimulation hormonale.

La spécificité de l'action de chacun des récepteurs nucléaires est régit par sa capacité à reconnaître une séquence spécifique de l'ADN.

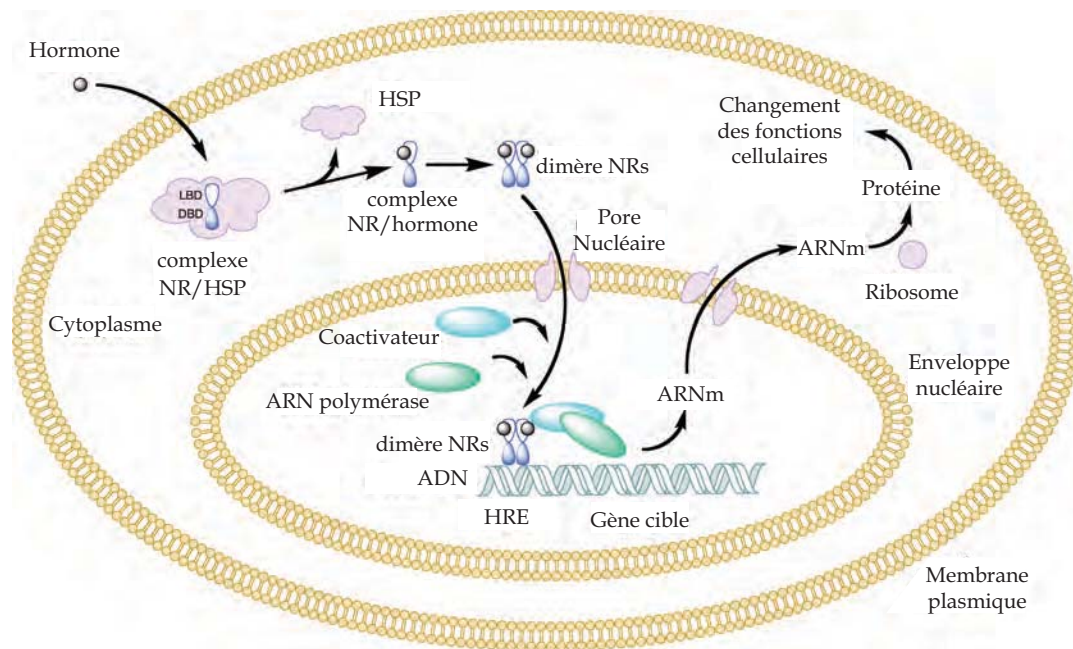
#### 3.1.2.1. SPÉCIFICITÉ DE LIAISON À L'ADN

##### CRITÈRES DE LA SPÉCIFICITÉ DE LIAISON À L'ADN DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

En tant que facteur de transcription ligand-dépendant, la liaison des récepteurs nucléaires à des séquences spécifiques de l'ADN constitue une étape cruciale dans la transcription de leurs gènes cibles.

La spécificité de liaison à l'ADN ne repose que sur deux critères : la séquence du motif ADN reconnu et le mode de dimérisation des récepteurs nucléaires. De façon étonnante, il n'existe que peu de motifs. Le motif principal : PuG<sup>A</sup>/TACA est reconnu par les récepteurs GRs, ARs, PRs et MRs, tandis que le motif PuG<sup>G</sup>/TCA est sélectivement lié par les récepteurs des œstrogènes et les récepteurs des hormones non-stéroïdiennes (Bjornstrom *et al.*, 2005; Chandler *et al.*, 1983). Un niveau de complexité est ajouté par les variations dans le mode de dimérisation des récepteurs nucléaires, qui peuvent lier l'ADN sous forme d'homodimères, comme la majorité des récepteurs stéroïdiens, d'hétérodimère avec RXR par exemple ou encore plus





**Figure 13 : Modèle d'action classique des récepteurs nucléaires hormonaux**

L'hormone traverse la membrane plasmique et se lie au récepteur, provoquant un changement de conformation de ce dernier. Le récepteur lié à l'hormone, en conformation agoniste est libéré du complexe inhibiteur, dimérise et va lier son élément de réponse aux hormones spécifique en amont de ses gènes cibles. Co-activateurs de la transcription et ARN polymérase sont recruté et permettent la transcription du gène cible. La protéine produite influencera alors le fonctionnement de la cellule en réponse à la stimulation hormonale.

Adaptée de Boghog *et al.*, 2007.

rarement sous forme monomériques (figure 14). Ce mode de dimérisation va avoir une influence directe sur l'organisation des répétitions des motifs ADN liés, puisque le DBD de chaque monomère reconnaît un motif. Ainsi, ils peuvent être organisés en répétition direct, palindrome ou palindrome inversé.

Par exemple, les récepteurs des œstrogènes lient le motif PuGGTCA organisé en palindrome séparé de trois paires de bases (ERE consensus) (Mader *et al.*, 1993; Mader *et al.*, 1993)(figure 15), tandis que le récepteur thyroïdien TR lie le même motif, cette fois sous forme de répétition direct toujours séparé par trois paires de bases (Tableau III). Par contre, les récepteurs GR lient également des motifs palindromiques, mais différents PuGAACA (Chandler *et al.*, 1983). Dans la majorité des cas, les récepteurs des œstrogènes lient l'ADN sous forme d'homodimère. Ils sont cependant capables de former des hétérodimères ER $\alpha$ -ER $\beta$ , mais leur affinité est moindre (Cowley *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1998). Les distributions des homo ou hétéro-dimère dépendent des niveaux d'expression de chaque isoforme dans les différents types cellulaires (Hall *et al.*, 1999). Le DBD, ou plus précisément, l'hélice de reconnaissance à l'ADN des récepteurs nucléaires est responsable de cette ségrégation entre les motifs ADN liés.

#### LIAISON DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES À LEURS ÉLÉMENTS DE RÉPONSE ADN, LES ERES

---

Les régions C et D des récepteurs nucléaires comportent le DBD. Dans le cadre des récepteurs des œstrogènes, ces domaines présentent les séquences les plus conservées entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ , avec 97% d'homologie de séquence (Kuiper *et al.*, 1998). La structure du DBD, imposée par la présence des deux doigts de zinc à quatre cystéines, permet la liaison des récepteurs nucléaires au niveau du sillon majeur de l'ADN (figure 16 et 17) (Schwabe *et al.*, 1993). La spécificité de liaison à l'ADN est, quant à elle, dictée par la séquence primaire d'acides aminés de l'hélice de reconnaissance à l'ADN. Plus particulièrement, les trois acides aminés de la Pbox sont impliqués dans la spécificité de liaison des récepteurs nucléaires (Mader *et al.*, 1989). Ces acides aminés permettent la distinction des éléments de réponse des

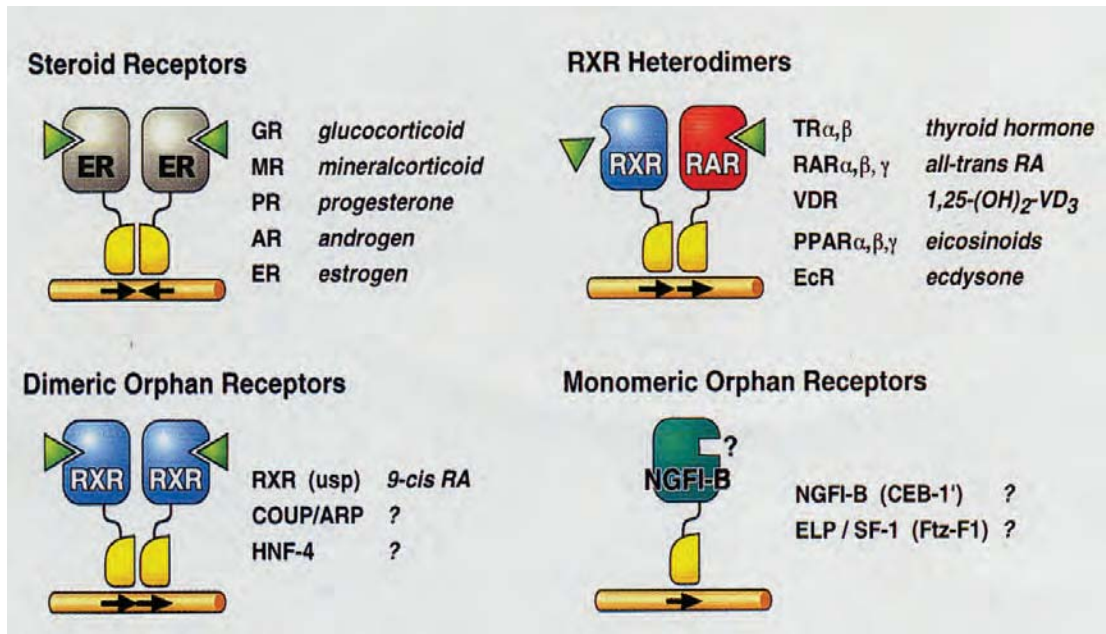


Figure 14 : Mode de liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires lient l'ADN, majoritairement sous forme dimérique. De ce fait, ils lient des motifs répétés. Ces derniers peuvent être organisés sous forme de répétitions inversées ou palindrome, ou sous forme de répétitions directes. L'espacement entre les motifs influence également la spécificité de liaison.

Adaptée de Mangelsdorf *et al.*, 1995

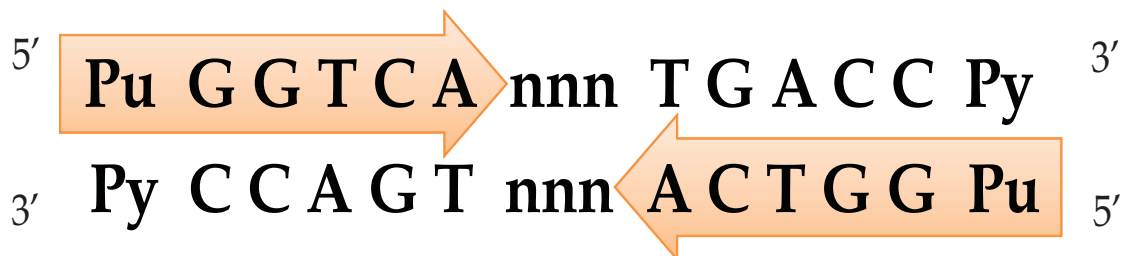


Figure 15 : Séquence consensus de l'élément de réponse aux œstrogènes : ERE

**Tableau III : Hélice de reconnaissance à l'ADN des récepteurs nucléaires en lien avec l'organisation de leurs éléments de réponse à l'ADN.**

Hélice de reconnaissance à l'ADN														
	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	Motifs ADN
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Cys	<b>Glu</b>	Gly	Cys	<b>Lys</b>	Ala	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ser	Ile	Gln	<i>PuGGTCA</i> IR3
<b>GR</b>	Cys	<b>Gly</b>	Ser	Cys	<b>Lys</b>	Val	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ala	Val	Glu	<i>PuGAACA</i> IR3
<b>AR</b>	Cys	<b>Gly</b>	Ser	Cys	<b>Lys</b>	Val	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ala	Ala	Glu	<i>PuGAACA</i> IR3
<b>TR</b>	Cys	<b>Glu</b>	Gly	Cys	<b>Lys</b>	Gly	Phe	Phe	<b>Arg</b>	<b>Arg</b>	Thr	Ile	Gln	<i>PuGGTCA</i> DR3
<b>RXR<math>\alpha</math></b>	Cys	<b>Glu</b>	Gly	Cys	<b>Lys</b>	Gly	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Thr	Val	Arg	<i>AGGTCA</i> DR1
<b>TLX</b>	Cys	<b>Asp</b>	Gly	Cys	<b>Ser</b>	Gly	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Ser	Ile	Arg	<i>AAGTCA</i> NR
<b>PNR</b>	Cys	<b>Asn</b>	Gly	Cys	<b>Ser</b>	Gly	Phe	Phe	<b>Lys</b>	<b>Arg</b>	Val	Ile	Arg	<i>AAGTCA</i> DR1

Les homologues de séquences primaires des hélices de reconnaissance à l'ADN de divers récepteurs nucléaires sont représentées par rapport au récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ . Ainsi, les numéros correspondent aux acides aminés de la séquence complète de ER $\alpha$ . Les motifs ADN et leur organisation sont notés en italiques dans les colonnes de droite. Les lettres représentent l'organisation des motifs, tandis que le chiffre fait état du nombre de paires de bases séparant les motifs entre eux. Par exemple, IR3 désigne des motifs organisés en répétitions inversées ou palindrome séparés de 3 paires de bases. DR : répétitions directes, NR : motif non répété.

œstrogènes et des glucocorticoïdes par leurs récepteurs respectifs (Mader *et al.*, 1989). La structure cristallographique de dimères de DBD de ER $\alpha$  liés à l'ADN a mis en évidence des contacts directs entre les bases de l'ERE et quatre acides aminés de l'hélice de reconnaissance à l'ADN (figure 17 et 18) (Schwabe *et al.*, 1993). Les résidus K206 lie la base G-5 de l'ERE consensus et R211 celle en G+2. Les interactions entre les acides aminés E203 et K210 et les bases de l'ADN sont plus complexes, puisque ces résidus lient les mêmes paires de bases de l'ERE GT/-4-3 sur les brins complémentaires de l'ADN. Ces interactions spécifiques entre les acides aminés de l'hélice de reconnaissance à l'ADN de ER $\alpha$  et les bases sont responsables de la liaison spécifique de ER $\alpha$  aux EREs (Schwabe *et al.*, 1993). L'hélice de reconnaissance à l'ADN comporte également la Dbox, dont les acides aminés sont impliqués dans la dimérisation des récepteurs stéroïdiens. La dimérisation des récepteurs permet, d'une part, de stabiliser leur liaison à l'ADN (Watanabe *et al.*, 2007), d'autre part, elle dicte l'espacement de 3 bases entre les 2 bras du palindrome des EREs (Freedman, 1992; Mader *et al.*, 1993; Zilliacus *et al.*, 1995) (figure 16). La queue N-terminale du DBD est également nécessaire à la dimérisation des récepteurs ainsi qu'à la stabilisation de leur liaison à l'ADN (Mader *et al.*, 1993).

Selon un modèle publié par Watanabe *et al.* en 2007, la fixation d'un dimère de récepteurs ER $\alpha$ , plutôt que d'un monomère, serait à la base de la formation d'un complexe stable (Watanabe *et al.*, 2007)(figure 19). En effet, lors de la fixation d'un monomère ER-DBD à l'ADN, des interactions électrostatiques non-spécifiques entre les groupes phosphates de l'ADN et les acides aminés ont lieu, cependant l'interaction conserverait une liberté de rotation ne permettant pas la formation d'un complexe stable. A l'inverse, la fixation d'un dimère de DBD engendre deux points de liaison, mettant en jeu ces mêmes interactions électrostatiques, ne permettant plus de rotation. Plusieurs modèles bio-informatiques mettent en évidence une forte liaison entre le DBD de ER $\alpha$  et le squelette phosphaté de l'ADN au niveau de la base -1 de ERE (D'Alessio *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007).



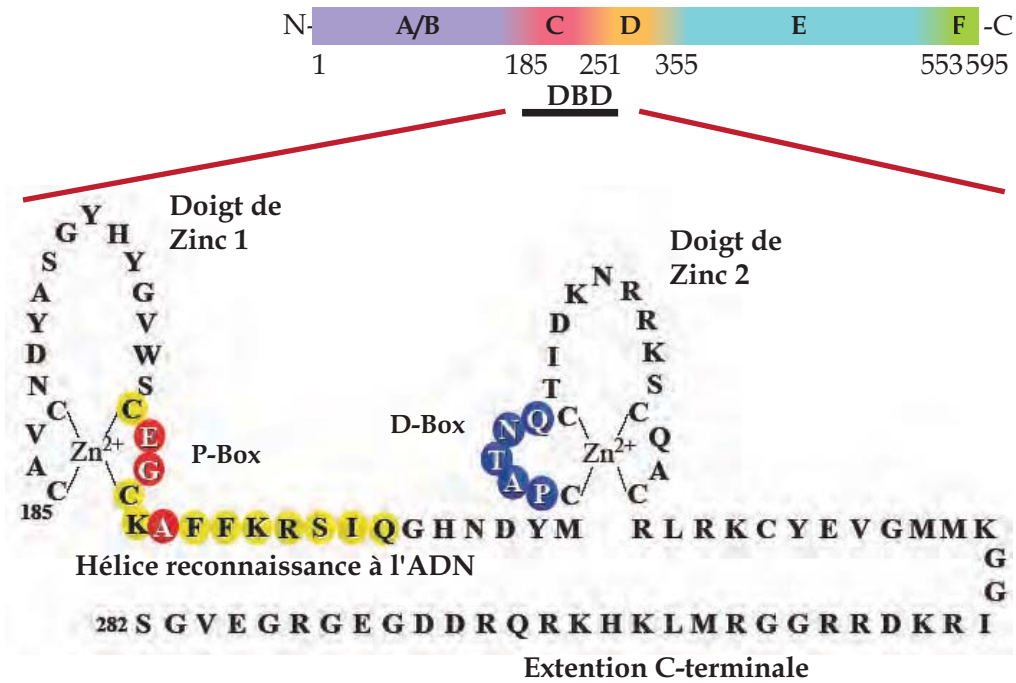


Figure 16 : Représentation schématique de la séquence primaire du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ .

Le DBD des récepteurs nucléaires sont constitué de deux doigts de zinc à quatre cystéines. Les acides aminés de l'hélice de reconnaissance à l'ADN sont représentés en jaune, ceux de la P-box en rouge et ceux de la D-box en bleu.

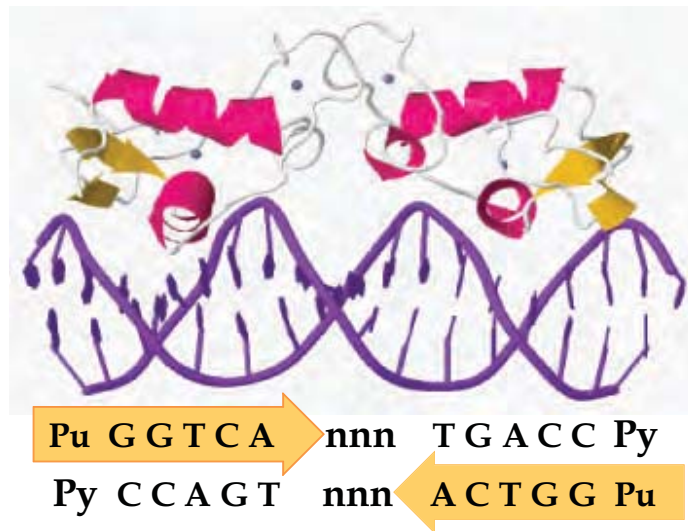
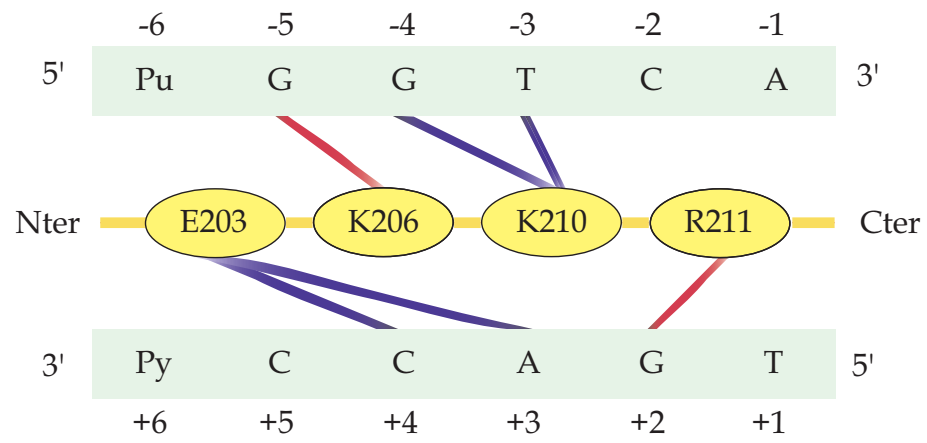


Figure 17 : Modélisation de la liaison d'un dimère de DBD de ER $\alpha$  à un ERE consensus.



*Figure 18 : Interactions entre les acides aminés de ER $\alpha$  et les bases de l'ERE*



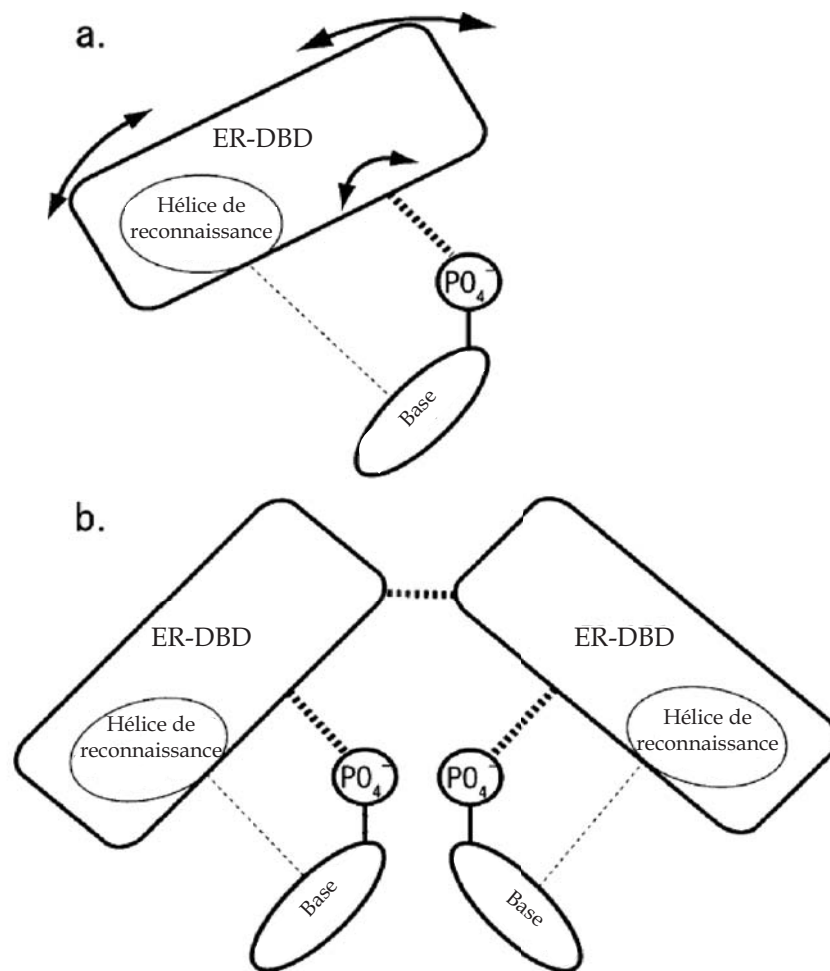


Figure 19 : Conceptualisation de la liaison des ERs à l'ADN.

Le DBD de ER sous forme monomérique présente une liberté de rotation représentée par les flèches (a.). La liaison d'un dimère de DBD permet de fixer la position de par l'interaction double avec l'ADN d'une part et la liaison des DBD entre eux d'autres part, ne permettant plus de rotation (b.)

Adaptée de Watanabe *et al.*, 2007.

### 3.1.2.1. MODÈLES BIO-INFORMATIQUES DE PRÉDICTION DE LA LIAISON DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION À L'ADN

La liaison des facteurs de transcription à l'ADN constituant l'étape clé de l'activation de la transcription de leurs gènes cibles, un code de reconnaissances entre les résidus protéiques et les bases de l'ADN interagissant est recherché depuis de nombreuses années. Dès la publication des premiers cristaux de complexes protéines-ADN, l'hypothèse selon laquelle seuls quelques acides aminés particuliers reconnaissent spécifiquement les bases de l'ADN en fonction de leurs propriétés chimiques est née et avec elle, le Désir de prédire de tels contacts (Raviscioni *et al.*, 2005). Ainsi, les chercheurs ont supposé l'existence d'un code de reconnaissance universel qui gouvernerait la spécificité de liaison protéine-ADN (Pabo *et al.*, 1984; Seeman *et al.*, 1976) . Cependant, plus les analyses de nouvelles structures protéine-ADN étaient résolues, plus la complexité des mécanismes de la liaison protéine-ADN était mise en évidence et l'existence d'un code de reconnaissance universel mise à mal (Matthews, 1988). C'est dans ce contexte que Suzuki et al. ont publié quatre codes de reconnaissance spécifiques à quatre familles de facteurs de transcription dont les récepteurs nucléaires hormonaux (Suzuki *et al.*, 1994).

Les codes de reconnaissance de la liaison des facteurs de transcription à l'ADN découlent d'un modèle informatique construit à partir des structures cristallographiques de ces protéines liés à l'ADN. Plus précisément, des règles chimiques listent tous les contacts possibles entre les 20 acides aminés et les quatre bases, par des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes. De plus, puisque la taille des résidus est également importante, ils ont été classifiés en fonction de la taille de leur chaîne latérale. Des « points chimiques » reflétant l'énergie de liaison de chaque interaction entre un acide aminé et une base ont alors été calculés. Jusqu'à cette étape, les règles utilisées sont applicable à toutes les interactions protéine-ADN. Par contre, les règles stéréochimiques et les points qui y sont rattachés sont spécifiques à chacune des familles de facteurs de transcription. Les « points stéréochimiques » décrivent les interactions entre un groupe d'acides aminés et de bases spécifiques. Finalement, la prise en compte de ces deux types de points,

chimiques et stéréochimiques, permettent de calculer un « score de liaison ». Ce dernier reflète la concordance entre une base et un acide aminé à une position donnée de l'hélice de reconnaissance à l'ADN du facteur de transcription. Selon Suzuki et al. : “the rules are specific enough to predict DNA-binding characteristic from a protein sequence”. Ainsi, leurs résultats constitueraient un code de reconnaissance à l'ADN (Suzuki *et al.*, 1994). Il est cependant important de garder en tête que certaines simplifications ont été nécessaires à l'élaboration de ce modèle et pourrait en altérer les prédictions : (i) lorsque plusieurs contacts étaient possibles entre une protéine et différentes séquences ADN, seul celui avec le score plus élevé a été conservé; (ii) un seul contact entre un résidu et une base a été considéré.

L'organisation modulaire des récepteurs nucléaires, dont le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ , leur permettent d'agir comme des facteurs de transcription ligands dépendant. Ainsi, suite à la liaison des œstrogènes, ER $\alpha$  va induire une cascade d'évènements permettant à la cellule de moduler ses activités en réponse à ce stimulus.

### 3.2. SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES PAR LEUR RÉCEPTEUR ER $\alpha$

La liaison des œstrogènes à leur récepteur ER $\alpha$  va donner naissance à plusieurs voies de signalisation qui, de façon surprenante, ne mettent pas toutes en jeu la liaison directe du récepteur aux EREs. Les récepteurs des œstrogènes peuvent, par exemple, induire indirectement l'expression de gènes sous la dépendance de site AP-1, ou encore répondre aux signaux facteurs de croissance et induire l'expression de leurs gènes cibles en absence d'œstrogènes et même provoquer des effets physiologiques sans impliquer la transcription de gène (figure 20) (Heldring *et al.*, 2007).

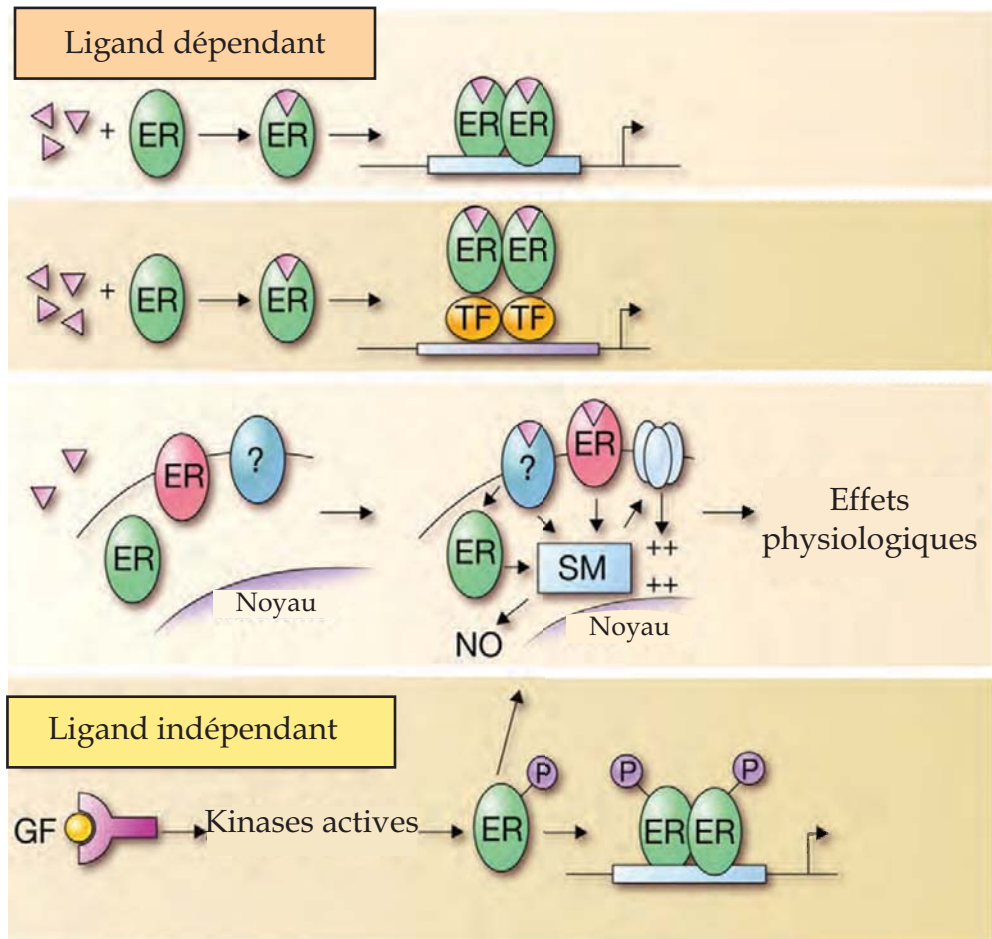


Figure 20 : Les différentes voies de signalisation des oestrogènes

La voie classique, génomique ERE-dépendante, est activée par la liaison des oestrogènes au récepteur ER $\alpha$  et aboutie à la modulation de la transcription des gènes cibles des oestrogènes suite à la liaison directe des EREs. La voie génomique indirecte implique des interactions protéines-protéines entre ER $\alpha$  et d'autres facteurs de transcription, en réponse à la liaison des oestrogènes. Ces interactions vont permettre la régulation de l'expression des gènes par une interaction indirecte entre l'ADN et le récepteur des oestrogènes en conformation agoniste. Les effets rapides des oestrogènes résultent de la voie non-génomique activée dans de nombreux tissus, mais pas encore bien comprise. Elle pourrait impliquer l'activation d'un récepteur à la membrane plasmique ou nucléaire. L'induction de la cascade d'effecteurs pourrait être activée directement par le récepteur ou mettre en jeu un second messenger, menant à la réponse physiologique rapide n'impliquant pas la régulation de gènes. Finalement, la voie de signalisation non-génomique à génomique est ligand-indépendante : elle est activée par d'autres voies de signalisation comme celle des facteurs de croissance, par exemple. Alors, ER $\alpha$  est activé par phosphorylation, ce qui induit sa dimérisation, sa liaison à l'ADN et enfin, la régulation de la transcription.

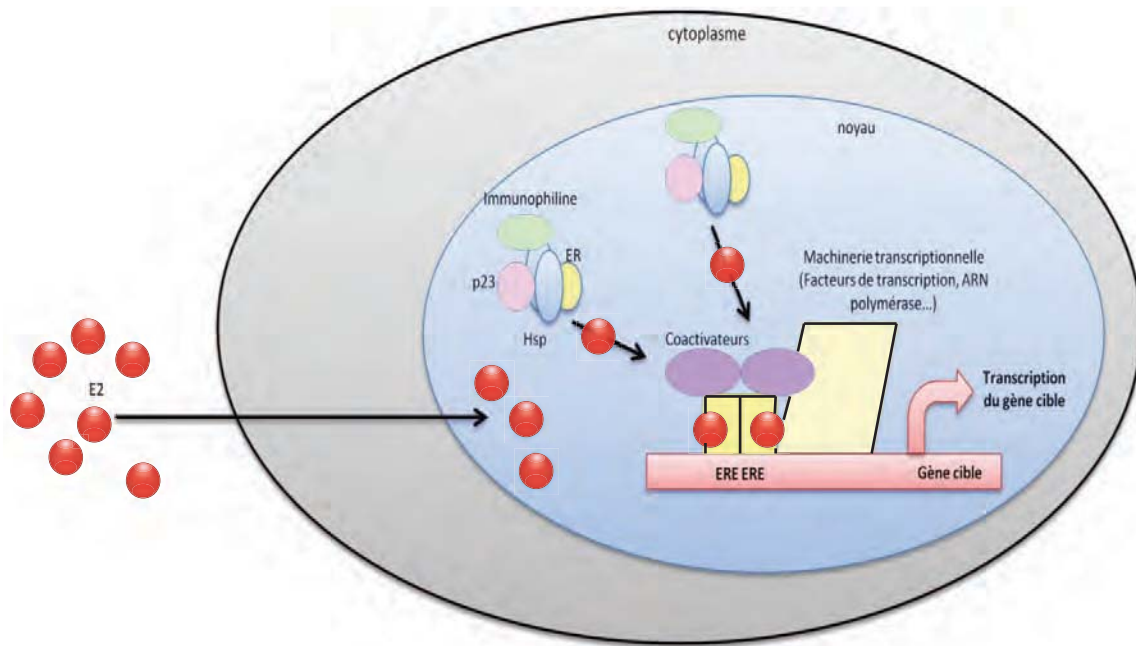
Adaptée de Heldring *et al.*, 2007.

### 3.2.1. VOIE GÉNOMIQUE ERE-DÉPENDANTE CLASSIQUE

Le mode d'action classique des œstrogènes est la voie génomique ERE-dépendante qui correspond au modèle d'action générale des récepteurs hormonaux. En absence de stimulation œstrogénique, les récepteurs des œstrogènes sont majoritairement monomériques et localisés dans le noyau. Ils sont alors maintenus sous forme inactive, complexés à des protéines chaperonnes : des protéines du choc thermique, dont Hsp90 ou Hsp70, et des immunophilines (Jensen *et al.*, 1969; Pratt *et al.*, 1997; Ylikomi *et al.*, 1998) (figure 21). Les œstrogènes étant des hormones lipophiles, elles diffusent passivement à travers les membranes cellulaires. Leur liaison au LBD des récepteurs des œstrogènes va provoquer un changement de conformation permettant la libération du récepteur du complexe inactivateur et sa dimérisation. Les dimères de récepteurs des œstrogènes vont alors interagir spécifiquement avec l'ADN, au niveau de leurs éléments de réponse. Ces derniers sont situés dans les promoteurs des gènes cibles des œstrogènes, tels que TFF1 ou c-myc (Klein-Hitpass *et al.*, 1986; Klinge, 2001; Shang *et al.*, 2000). La poche hydrophobe créée par la conformation agoniste de l'hélice H12 du LBD permet le recrutement de co-activateurs présentant des activités histones acétylases et méthyltransférase. Leurs activités, associées au recrutement de nouvelles protéines, vont avoir pour effet d'ouvrir la chromatine, de recruter la machine transcriptionnelle et ainsi de stimuler la transcription des gènes cibles des œstrogènes.

### 3.2.2. IMPACT DE LA LIAISON DU LIGAND SUR L'ACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION HORMONO-DÉPENDANTE : IMPORTANCE DE L'HÉLICE H12

La première étape de la transactivation du signal hormonal repose sur la liaison des œstrogènes au niveau du LBD de leurs récepteurs. Ce dernier est situé dans la région E, qui contient également la fonction de transactivation AF-2 hormono-dépendante (*hélices 3, 4, 5 et 12*). Cette région est aussi responsable des interactions protéine-protéine (via des motifs LXXLL) entre ER $\alpha$  et les co-



*Figure 21 : Voie de signalisation des œstrogènes ERE-dépendante*

Les œstrogènes étant des hormones lipophiles, elles diffusent passivement à travers la membrane plasmique. Leur liaison au LBD des récepteurs des œstrogènes va provoquer un changement de conformation. Ceci permet au récepteur de se libérer du complexe inactivateur et leur dimérisation. Les dimères de récepteurs vont alors interagissent spécifiquement avec l'ADN, au niveau de leurs éléments de réponse EREs, situés en amont des gènes cibles des œstrogènes. Les co-activateurs et la machinerie transcriptionnelle sont recrutées, permettant la transcription des gènes.

Adaptée de Le Grand *et al.*, 2010.

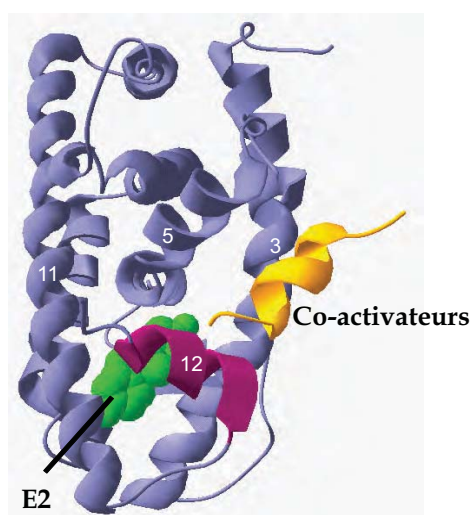
régulateurs. Ainsi ce sont les déterminants du LBD qui maintiennent la fonction AF-2 inactive en absence de ligand et permettent la liaison du récepteur avec le complexe inactivateur. Ils sont également responsables du maintien de ER $\alpha$  sous forme monomérique en absence d'œstrogène. Le LBD est constitué des hélices 3 à 12, qui vont former une cavité hydrophobe capable d'accueillir les ligands (Edwards, 2000). Plus précisément, la position de l'hélice 12 va déterminer l'activité du récepteur. Lors de la liaison de 17 $\beta$ -œstradiol dans la poche du LBD de ER $\alpha$ , un changement de conformation va s'opérer, l'hélice H12 va alors se stabiliser de manière à clore la poche de liaison du ligand (Egner *et al.*, 2001; Wurtz *et al.*, 1996) (figure 22). Cette conformation agoniste va créer une surface hydrophobe qui va permettre des interactions avec les co-activateurs de la transcription (Brzozowski *et al.*, 1997; Nolte *et al.*, 1998). Ce changement de conformation va également libérer le complexe protéique inactivateur composé des protéines du choc thermique et des immunophilines (Ylikomi *et al.*, 1998). Finalement, le dimère de récepteurs en conformation agoniste transloque vers le noyau. Le dimère de récepteurs va alors lier les EREs, et activer la transcription œstrogène-dépendante des gènes via AF-2 dont l'activité repose sur le changement de conformation intervenant à la liaison d'un agoniste (Scherrer *et al.*, 1993).

### 3.2.2.1. GÈNES CIBLES DES ŒSTROGÈNES ET ERES

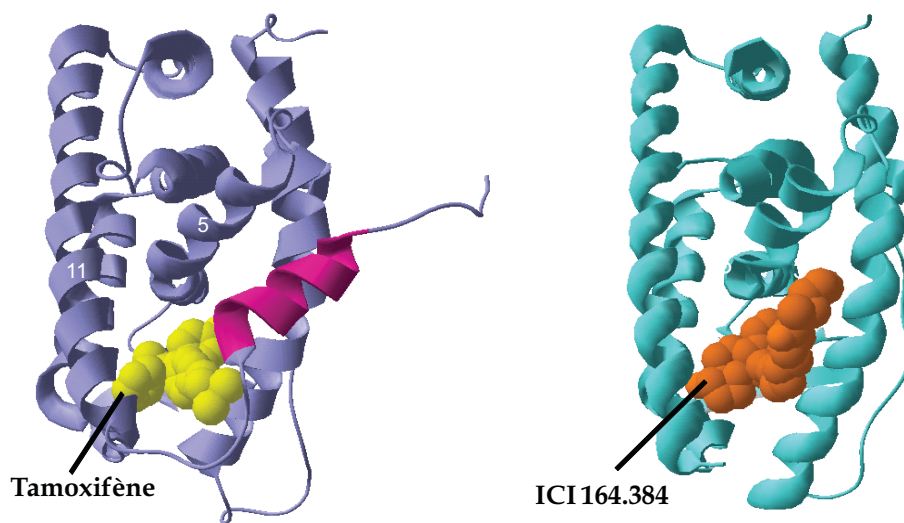
De récentes études menées par le groupe de M. Brown ont identifié de très nombreux sites de liaison du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  par une technique d'immunoprécipitation de la chromatine combinée à des puces à ADN, permettant la recherche de tels sites à l'échelle du génome en entier (Carroll *et al.*, 2006). Malgré la grande spécificité de la liaison des œstrogènes à l'ADN, très peu d'ERE consensus sont détectés dans les promoteurs des gènes cibles des œstrogènes. En fait, la plupart des gènes cibles des œstrogènes ne contiennent pas d'ERE palindromiques parfaits dans leur promoteur. A la place, la signalisation des œstrogènes est médiée par des



### Conformation agoniste du LBD du récepteur ERa



### Conformation antagoniste du LBD du récepteur ERa



*Figure 22 : Conformations agonistes et antagonistes du LBD des récepteurs des œstrogènes en fonction des ligands.*

En présence de E2 (vert), l'hélice H12 (rose) du LBD de ERa se place en conformation agoniste au dessus de la poche de liaison du ligand libérant le sillon de liaison des co-activateurs formé par les hélice H3, H4 et H5. Lors de la liaison d'anti-œstrogènes partiels, tel que le tamoxifène (jaune), à ERa, l'hélice H12 (rose) est poussée sur le côté au dessus du sillon de recrutement des co-activateurs. La liaison de ICI164.384 (orange) au récepteur ERb, ne permet pas la résolution de la position de l'hélice H12, suggérant sa mobilité. Néanmoins, l'occupation du sillon de liaison des co-activateurs par la chaîne latérale de ICI164.384 prévient le recrutement de ces derniers.

Adaptée de Lupien *et al.*, 2005.

EREs imparfaits (Anolik *et al.*, 1995; Bourdeau *et al.*, 2004; Driscoll *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2004; Klinge, 2001; O'Lone *et al.*, 2004; Schwabe *et al.*, 1995). Néanmoins, la plupart contiennent quatre ou cinq nucléotides de l'ERE consensus (Dana *et al.*, 1994). Plus le nombre de nucléotides variant par rapport à l'ERE consensus augmente, plus l'affinité de liaison diminue, particulièrement lorsque les mutations portent sur les deux branches du palindrome (Driscoll *et al.*, 1998; Gruber *et al.*, 2004; Klinge, 1999; Klinge, 2001; Klinge *et al.*, 1996). Les récepteurs des œstrogènes sont également capables de lier des EREs dont l'espacement entre les branches du palindrome ou l'orientation des motifs sont modifiés, néanmoins, leurs affinités de liaison sont moindres (Mader *et al.*, 1993). Or, depuis plusieurs années, de nombreux efforts ont été réalisés afin d'identifier les sites de liaison des récepteurs des œstrogènes au sein du génome humain à l'aide de techniques d'immunoprécipitation combinée à des analyse à l'aide de micropuces ADN (Bourdeau *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2004; Laganier *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Rochira *et al.*, 2005). Ces études ont confirmé l'identification de gènes cibles directs des œstrogènes par la présence d'EREs parfaits ou imparfaits. Mais elles ont aussi démontré que la présence d'un ERE dans le promoteur d'un gène ne fait pas nécessairement de celui-ci une cible des œstrogènes. Elles ont également établi que les récepteurs des œstrogènes lient des régions parfois lointaines des gènes régulés, jusqu'à 10kb en amont et 5kb en aval du site d'initiation de la transcription (TSS) du gène régulé (Bourdeau *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 2005). De plus, les EREs peuvent faire partie d'une régulation transcriptionnelle sur une longue distance en formant des boucles de chromatine entre plusieurs enhancers. Ainsi, trois EREs consensus, distants de 21kpb, s'associent entre eux suite à la formation de boucles de chromatine pour réguler la transcription du gène cible des œstrogènes GREB1 (Deschenes *et al.*, 2007).

Les gènes cibles des œstrogènes sont classés selon 2 catégories : les gènes cibles directs ou primaires et les gènes cibles indirects ou secondaires (O'Lone *et al.*, 2004). Afin de les distinguer les régions promotrices des gènes cibles primaires doivent répondre à deux critères expérimentaux : (i) les promoteurs doivent répondre directement aux œstrogènes ; (ii) la liaison des récepteurs des œstrogènes doit être

démontrée, par exemple par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. De part leur définition, les régions promotrices des gènes cibles primaires des œstrogènes présentent dans la majorité des cas des EREs (Bourdeau *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2002; Shupnik *et al.*, 1991). Néanmoins, ER $\alpha$  peut également lier des demi-EREs, en coopération avec d'autres demi-EREs distants ou avec d'autres sites de liaison de facteurs de transcription tels que les sites Sp1 (Porter *et al.*, 1997). En fait, 35% des gènes cibles primaires des œstrogènes ne contiennent pas d'EREs, même imparfait, au sein de leurs régions promotrices (O'Lone *et al.*, 2004). Ceci a été mis en évidence par l'étude des profils d'expression des gènes des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives, ZR-75, T-47D et MCF-7, par micropuces à la suite de traitement œstrogénique en présence de cycloheximide (Lin *et al.*, 2004; Soulez *et al.*, 2001). La cycloheximide, inhibant la synthèse de protéines, permet d'observer la modulation directe des gènes cibles des œstrogènes seulement. D'autres gènes cibles primaires présentent une liaison indirecte à l'ADN, fréquemment sous la dépendance d'autres facteurs de transcription tels que Sp1 (Krishnan *et al.*, 1994; Orimo *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1997; Watson *et al.*, 1991), AP1 (MacGregor *et al.*, 1998; Umayahara *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 1999) ou encore STAT5 (Bjornstrom *et al.*, 2001). FOXA1 constitue un autre exemple de collaboration entre facteurs de transcription, sa présence à proximité du site de liaison de ER $\alpha$  est requise pour la fixation de ER $\alpha$  au promoteur (Carroll *et al.*, 2005). L'activation de la voie génomique ERE-indépendante des œstrogènes (paragraphe 3.2.2) résulte de la coopération des récepteurs des œstrogènes avec d'autres facteurs de la transcription.

#### 3.2.2.2. MODÈLE DYNAMIQUE DE TRANSCRIPTION ŒSTROGÈNO-DÉPENDANTE

Plus précisément, une fois lié à l'ADN, ER $\alpha$  commence par recruter le complexe SWI-SNF, qui remodèle la chromatine de manière ATP-dépendante (Fryer *et al.*, 1998; Yoshinaga *et al.*, 1992). Dans les minutes suivant le recrutement de ER $\alpha$  à l'ADN, le complexe CBP/p160 est recruté, induisant une augmentation de l'acétylation des histones (Chakravarti *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 1996). Ce complexe

participe également au recrutement de méthyltransférase, PRMT1-2 ou CARM1 (Chen *et al.*, 1999). Les différents complexes recrutés ont tous pour effet de remodeler la chromatine vers une conformation plus ouverte et ainsi de faciliter le recrutement de nouveaux co-facteurs. Le complexe médiateur est alors recruté, facilitant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale, dont la RNA polymérase II (Pol II) (Fondell *et al.*, 1996; Rachez *et al.*, 1999; Reinberg *et al.*, 1998). Le complexe médiateur est par la suite remplacé par le complexe élongateur. Une quarantaine de minutes est nécessaire au recrutement de ces nombreux co-activateurs transcriptionnels. Cependant les réponses aux œstrogènes se doivent d'être limitées dans le temps, afin que les cellules puissent détecter E2, y répondre, puis cesser la réponse. De ce fait, un complexe répresseur, contenant des protéines du choc thermique ainsi que des sous-unités du protéasome, est recruté au niveau du promoteur actif. Le récepteur des œstrogènes est dégradé après avoir activé la transcription de ses gènes cibles. Metivier *et al.* ont utilisé des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine afin de mettre en évidence ce recrutement ordonné et séquentiel de co-facteurs au niveau d'un gène cible endogène des œstrogènes pS2 ou TFF1 (Metivier *et al.*, 2003).

Cette valse de co-facteurs aboutissant à la transcription et à la dégradation du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  permet à la cellule d'adapter continuellement le niveau de transcription d'un gène, en réponse aux différentes situations et en restreignant la durée de son activation.

### 3.2.3. VOIE GÉNOMIQUE ERE-INDÉPENDANTE

En plus de son action en tant que facteur de transcription par la voie classique génomique ERE-dépendante, ER $\alpha$  est également capable d'interagir avec les éléments de réponse d'autres facteurs de transcription, tels Fos/Jun (sites AP-1) (Kushner *et al.*, 2000) ou SP-1 (Saville *et al.*, 2000) (figure 20). Cette propriété des récepteurs des œstrogènes permet d'expliquer la régulation de l'expression de nombreux gènes œstrogène-dépendant ne contenant pas d'EREs au sein de leurs promoteurs. Dans ces cas, il agit comme co-facteur et ne lie pas directement l'ADN.

Néanmoins, les résultats des recherches divergent quant à l'implication du DBD. Par exemple, même en absence de DBD, le récepteur ER $\alpha$  est capable de potentialiser les effets de jun/fos (Jakacka *et al.*, 2001). A l'inverse, des mutations d'acides aminés du DBD de ER $\beta$  ne lui permettent plus de moduler la transcription des gènes en partenariat avec AP-1 (Sanchez *et al.*, 2002). Ainsi, le DBD pourrait être requis pour une bonne interaction protéine-protéine ou être impliqué dans le recrutement de co-régulateurs additionnels.

ER $\alpha$  peut aussi agir en tant que co-represseur, comme par exemple avec les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  or GATA1 (Blobel *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1995). La liaison de ER $\alpha$  à ces molécules réduit leur interaction avec l'ADN et par conséquent, la transcription de leurs gènes cibles (Galien *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 1994; Ray *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1995).

#### 3.2.4. VOIE NON-GÉNOMIQUE : EFFETS RAPIDES DES ŒSTROGÈNES

Certains effets des œstrogènes sont observables quelques minutes après l'exposition des cellules, ne laissant pas le temps à l'activation de la transcription et à la synthèse des protéines d'avoir lieu. Ces actions non-génomiques constituent une propriété commune des hormones stéroïdiennes et sont fréquemment associées aux cascades des kinases (figure 20). Même si les premiers effets rapides des stéroïdes avaient été mis en évidence dans les années 1940, l'activation des voies MAPK, PI3K/AKT et cAMP en quelques minutes n'a été mise en évidence que dans les années 1970, alors que les recherches s'attardaient à caractériser les gènes cibles des œstrogènes (Moriarty *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2005; Wehling *et al.*, 2006). Par la suite, ces voies non-génomiques des œstrogènes ont été définies et décrites dans divers tissus cibles, tels que la glande mammaires, les os ou encore les systèmes cardiovasculaire et nerveux, permettant d'expliquer les effets rapides des œstrogènes (Fiorelli *et al.*, 1996; Kousteni *et al.*, 2001; Kow *et al.*, 1998; Marquez *et al.*, 2001; Mendelsohn, 2000; Migliaccio *et al.*, 1993; Revelli *et al.*, 1998; Watson *et al.*, 1999;

Wehling, 1997). Les œstrogènes provoquent, par exemple, une mobilisation rapide du calcium intracellulaire, la production d'ATP, ou encore active la voie de signalisation des MAPK (Bjornstrom *et al.*, 2005). Plusieurs études suggèrent que ces réponses pourraient être médiées par une sous-population des récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$  localisée au niveau de la membrane cellulaire (Bjornstrom *et al.*, 2005). De récentes études font état d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G, GPR30, qui serait capable de lier E2 et d'activer les voies rapides. Cependant la localisation de ce dernier n'est pas claire, certaines études le mettent en évidence à la membrane plasmique tandis que d'autres seulement au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Filardo *et al.*, 2005; Revankar *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude démontre que l'activation des voies rapides des œstrogènes nécessite la présence de ER $\alpha$  et qu'aucune signalisation œstrogénique n'existe dans les cellules mammaires ER $\alpha$ -négatives SK-BR3 où GPR30 est pourtant présent (Filardo *et al.*, 2005; Moriarty *et al.*, 2006; Pedram *et al.*, 2006). Ainsi la localisation, comme le rôle de GPR30 dans la signalisation rapide des œstrogènes reste à clarifier.

Finalement, les mécanismes moléculaires des actions non-génomiques des œstrogènes semblent spécifiques aux types cellulaires et pourraient également dépendre de différentes conditions, telles que la quantité de molécules des différentes voies de signalisation, expliquant la diversité des réponses observées (Bjornstrom *et al.*, 2005).

### 3.2.5. VOIE NON-GÉNOMIQUE À GÉNOMIQUE : VOIE LIGAND-INDÉPENDANTE

Les effets non-génomiques des œstrogènes contribueraient également à la complexité de leur régulation de l'expression génique (Heldring *et al.*, 2007; Sanchez *et al.*, 2002). Les récepteurs des œstrogènes peuvent subir des modifications post-traductionnelles, telles que leur phosphorylation par la voie des MAP kinases en réponse à des signaux de croissance reçus par les cellules (figure 20). Le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ , ainsi activé, va se lier à ses EREs sur l'ADN et moduler la transcription de ses gènes cibles. Or la voie non-génomique rapide des œstrogènes est

également capable d'activer la cascade des MAPkinases. Ainsi, les actions non-génomiques rapides des œstrogènes pourraient moduler leur propre fonction et de cette manière potentialiser la voie génomique classique (Bjornstrom *et al.*, 2005).

### 3.2.6. MODULATION DE LA SIGNALISATION ŒSTROGÈNIQUE PAR LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE ER $\alpha$

Comme toute protéine, ER $\alpha$  peut subir des modifications post-traductionnelles qui vont moduler son activité. ER $\alpha$  peut être phosphorylé, acétylé, ubiquitinylé, sumoylé, mais aussi palmitoylé (Atsriku *et al.*, 2009).

Plusieurs sérines de ER $\alpha$ , situées dans toutes les régions qui le compose, sont susceptibles d'être phosphorylées (figure 23). Ces phosphorylations peuvent survenir suite à l'activation du récepteur par les œstrogènes ou résulter de l'activation de la voie non-génomique de ER $\alpha$ , tel que celle activée par des facteurs de croissance par exemple (Joel *et al.*, 1998; Joel *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 2006). Dans la majorité des cas, la phosphorylation de ER $\alpha$  a un effet positif sur son activité transcriptionnelle.

Elle peut (i) augmenter son activité cellulaire, (ii) potentialiser sa dimérisation, (iii) avoir un effet positif sur le recrutement des co-activateurs, (iv) augmenter sa liaison à l'ADN (Ali *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 1995; Bunone *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Dutertre *et al.*, 2003; Endoh *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 1995; Le Goff *et al.*, 1994).

L'impact de l'acétylation des récepteurs des œstrogènes ER $\alpha$  est bien moins documenté que celui de sa phosphorylation. Néanmoins, plusieurs sites d'acétylation du récepteur ont été mis en évidence récemment, mais les conséquences fonctionnelles restent à clarifier (figure 23). Leur acétylation aurait pour effet d'augmenter son activité transcriptionnelle. Suivant les lysines acétylées, il

semblerait que le récepteur voit son activité transcriptionnelle augmentée, ainsi que sa sensibilité aux œstrogènes ou encore sa liaison à l'ADN (Kim *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2001).

Le récepteur des œstrogènes peut également être sumoylé de manière ligand-dépendante, modulant ainsi son activité transcriptionnelle (Sentis *et al.*, 2005). Toujours de manière ligand-dépendante, ER $\alpha$  peut être ubiquitinylé, favorisant sa dégradation par le protéasome, ce qui joue un rôle primordiale dans la durée de son activité de transactivation de ses gènes cibles (cf. paragraphe 3.2.1) (Nawaz *et al.*, 1999; Nirmala *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 2003).

Les effets physiologiques des œstrogènes sont gérés, non pas par la voie génomique ERE-dépendante uniquement, mais par d'autres voies impliquant la liaison du récepteurs des œstrogènes de manière directe ou indirecte à l'ADN et aboutissant au contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes cibles primaires et secondaires des œstrogènes. Néanmoins, la signalisation des œstrogènes tend à promouvoir la croissance des cellules en potentialisant les signaux pro-prolifératifs et anti-apoptotiques des cellules ER $\alpha$ -positives. Les traitements anti-œstrogéniques visent à inhiber les effets des œstrogènes, en entrant en compétition avec le 17 $\beta$ -œstradiol pour la liaison de ER $\alpha$ . Ainsi, leur efficacité repose sur l'expression de ER $\alpha$  et la fonctionnalité des voies de signalisation des œstrogènes dans les tumeurs traitées (Thomas *et al.*, 2009).



### 3.3. MÉCANISMES D'ACTION DES ANTI-ŒSTROGÈNES

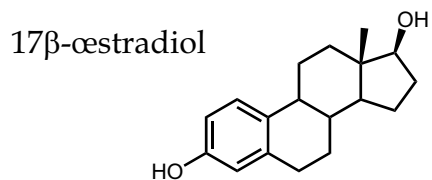
Les anti-œstrogènes sont des inhibiteurs compétitifs des œstrogènes pour la liaison aux récepteurs ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , leur permettant ainsi de contrer la signalisation des œstrogènes. Qu'ils soient partiels ou totaux, ils exercent leur effet antagoniste par le biais de leur chaîne latérale qui va ressortir de la poche de liaison du ligand et gêner le positionnement de l'hélice H12 (Jordan *et al.*, 1982; Robertson *et al.*, 1982) (figure 22) (Tableau IV). Anti-œstrogènes partiels ou totaux, ils vont se différencier par leur activité tissu-spécifique pour les premiers et leur capacité à induire la dégradation du récepteurs ER $\alpha$  pour les seconds.

#### 3.3.1. ANTI-ŒSTROGÈNES PARTIELS : ENTRE ANTAGONISTES ET AGONISTES DES RÉCEPTEURS DES ŒSTROGÈNES

Afin de décrire les mécanismes d'action des anti-œstrogènes partiels ou SERM, l'exemple du Tamoxifène<sup>©</sup> sera utilisé. Lors de la liaison réversible du Tamoxifène<sup>©</sup> dans la poche de liaison de ER $\alpha$ , la structure du LBD de ce dernier est la même qu'en présence de E2, à l'exception de l'hélice H12 (figure 22). La protubérance formée par la chaîne latérale du Tamoxifène<sup>©</sup> à l'extérieur de la poche de liaison ne permet pas à l'hélice H12 de prendre sa conformation agoniste, repliée au dessus de la poche de liaison. A la place, elle est repositionnée au niveau du sillon de recrutement des co-activateurs (Shiau *et al.*, 1998). Il en résulte une inhibition du recrutement des co-activateurs et ainsi une inactivation de la fonction AF-2 (Pike *et al.*, 1999; Shiau *et al.*, 1998). Par contre la libération du récepteur du complexe inhibiteur, formé par les Hsp, permet la dimérisation du complexe ER $\alpha$ -Tam, mais aussi de découvrir un site de liaison des co-répresseurs. Ainsi le complexe ER $\alpha$ -Tam conserve sa capacité de liaison à l'ADN, avec une affinité réduite par rapport à ER $\alpha$ -E2, et induit le recrutement de co-répresseurs, prévenant ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles des œstrogènes (Shang *et al.*, 2000). Ces co-répresseurs tels que NcoR et SMRT sont associés avec une activité HDAC induisant une

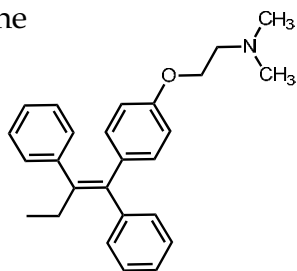
**Tableau IV : Structure du 17 $\beta$ -œstradiol et de différents anti-œstrogènes partiels ou totaux.**

**œstrogène**

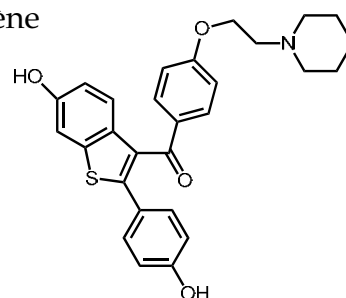


**Anti-œstrogènes partiels**

Tamoxifène

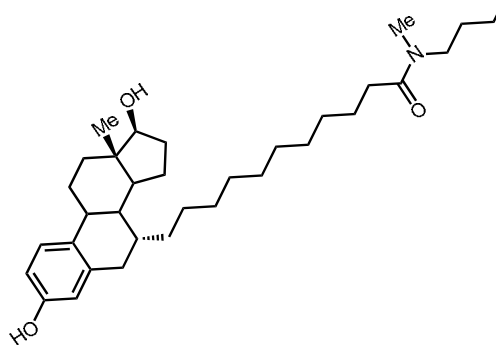


Raloxifène

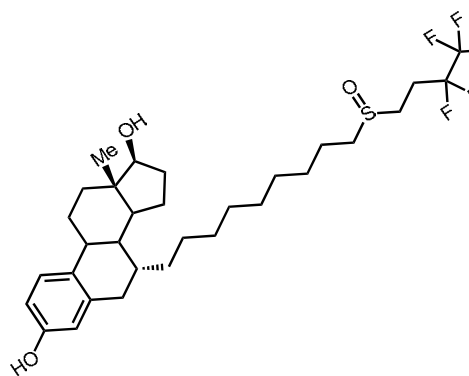


**Anti-œstrogènes totaux**

ICI 164.384



ICI 182.780



condensation de la chromatine (Lavinsky *et al.*, 1998; Shang *et al.*, 2000; Webb *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2002).

La répression de la fonction de transactivation AF-2 par le Tamoxifène<sup>®</sup> d'une part, et l'activation de la fonction AF-1 d'autre part, serait responsable du caractère antagoniste partiel du Tamoxifène<sup>®</sup>. En effet, l'activation de la fonction AF-1 serait responsable de la transcription des gènes cibles œstrogéniques de manière tissu- et promoteur-spécifique {Berry, 1990 #248;Tzukerman, 1994 #249}. Le ratio des niveaux de co-activateurs et de co-répresseurs seraient responsable de la fonction agoniste ou antagoniste du Tamoxifène<sup>®</sup> dans un type cellulaire donné (Shang *et al.*, 2002).

De plus, contrairement à la liaison de ER $\alpha$  par les œstrogènes, le Tamoxifène<sup>®</sup> n'induit sa dégradation. Il n'influence donc pas le taux de récepteur ER $\alpha$  cellulaire {Kiang, 1989 #251;Wijayaratne, 1999 #252}.

### 3.3.2. ANTI-ŒSTROGÈNES TOTAUX

L'anti-œstrogènes total ICI182.780 (noté ICI) a une affinité pour ER $\alpha$  équivalent à 89% de celle du 17 $\beta$ -œstradiol (noté E2) nettement supérieure à celle du Tamoxifène<sup>®</sup> qui correspondant seulement à 2,5% de celle de E2 (Wakeling *et al.*, 1991). De plus, ICI inhibe deux fois plus efficacement la croissance des cellules MCF-7 par rapport au Tamoxifène<sup>®</sup> (Wakeling *et al.*, 1991). Tout comme le Tamoxifène<sup>®</sup>, l'effet anti-œstrogénique de ICI résulte de la protusion de sa chaîne latérale à l'extérieur de la poche de liaison du ligand, au niveau de la poche de liaison des co-activateurs, ne permettant plus le replie de l'hélice H12. Cependant, la position de l'hélice H12 n'est pas définie dans le cadre des anti-œstrogènes totaux suggérant une grande mobilité de cette dernière. Il est important de noter que la structure cristallographique du complexe ER $\alpha$ -ICI n'est pas disponible et que les informations mentionnées ci-dessus découlent de la résolution du cristal de ER $\beta$ -ICI164-384. Néanmoins, les structures de ces composés sont très proches (Tableau IV) (Bowler *et al.*, 1989; Wakeling *et al.*, 1991). Toutefois, des expériences

d'anisotropie de fluorescence indiquent que l'hélice H12 ne peut se trouver en conformation agoniste au niveau du sillon de liaison des co-activateurs, ne permettant plus leur recrutement (Tamrazi *et al.*, 2003). Outre la modification de la conformation de l'hélice H12 du LBD, le mode d'action des anti-œstrogènes totaux diffère de celui des anti-œstrogènes partiels, comme cela est suggéré par l'absence de résistance croisée entre ces composés lors de leur administration aux patientes.

La liaison de ICI au récepteur ER $\alpha$  exerce plusieurs effets au niveau de la protéine, par contre ICI n'influence pas ses niveaux d'ARNm (McClelland *et al.*, 1996; Osborne *et al.*, 1995; Wakeling, 1995). En effet, ICI empêche la dimérisation du récepteur, sa translocation et bloque son recrutement au niveau des EREs. En effet, le complexe ER $\alpha$ -ICI est instable, il est rapidement polyubiquitinylé induisant sa dégradation par le protéasome et diminuant ainsi les niveaux de ER $\alpha$  cellulaires (Berry *et al.*, 2008; Wakeling *et al.*, 1987). De plus, ICI limite la mobilité nucléaire de ER $\alpha$ , et favorise même son export vers le cytoplasme (Dauvois *et al.*, 1992; Dauvois *et al.*, 1993; Htun *et al.*, 1999; Marsaud *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2008; Stenoien *et al.*, 2000; Stenoien *et al.*, 2001; Wijayaratne *et al.*, 2001). De ce fait, aucun complexe ER $\alpha$ -ICI lié à l'ADN n'ont été identifiés (Reid *et al.*, 2003). Le blocage de ER $\alpha$  et la réduction de ses niveaux cellulaires par ICI, inhibent de manière unique la signalisation par les œstrogènes, bloquant les voies ERE-dépendante et indépendante, mais aussi non-génomiques des œstrogènes (Bjornstrom *et al.*, 2005).

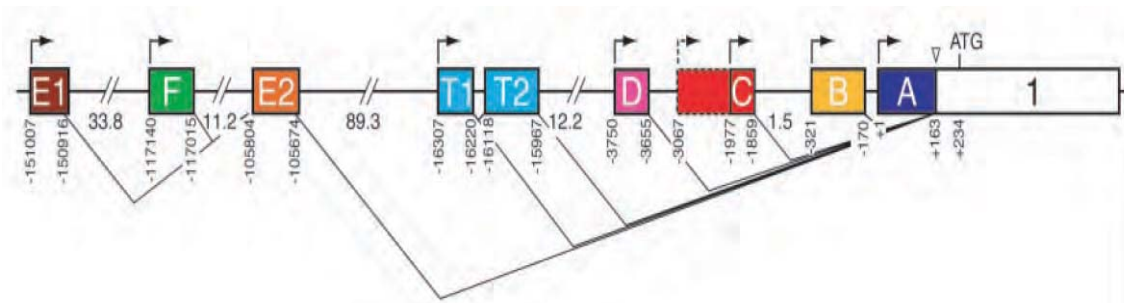
### 3.4. RÉGULATION DE L'EXPRESSION GÉNIQUE DE ER $\alpha$

Tout comme les œstrogènes et leurs récepteurs modulent très finement la transcription de leurs gènes cibles, l'expression du gène *ESR1*, codant pour ER $\alpha$ , est régulée.

#### PROMOTEURS ALTERNATIFS DE ESR1

---

Le gène *ESR1*, localisé sur le chromosome 6, fut cloné en 1986 et son organisation génomique décrite deux ans plus tard (Green *et al.*, 1986; Greene *et al.*, 1986). *ESR1* comporte huit exons et s'étale sur environ 300kb (Walter *et al.*, 1985). L'analyse des séquences des gènes d'autres récepteurs nucléaires met en évidence un train commun aux récepteurs stéroïdiens : l'expression de leurs gènes serait sous la dépendance de multiples promoteurs (Hodin *et al.*, 1989; Kastner *et al.*, 1990). Le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  n'échappe à la règle ; *ESR1* est transcrit à partir de sept promoteurs alternatifs donnant naissance à plusieurs isoformes d'ARNm possibles variant dans leur région 5' non traduite (figure 24) (Kos *et al.*, 2001). Ainsi, les différents ARNm sont tous traduits en une seule et même protéine ER $\alpha$ , de 66 kDa. Ces différents isoformes pourraient néanmoins avoir un impact important sur la stabilité des ARNm (Kos *et al.*, 2001). Les différents promoteurs seraient utilisés en fonction des types cellulaires et donc impliqués dans le contrôle de l'expression tissulaire de ER $\alpha$  (Reid *et al.*, 2002). Dans les cellules des glandes mammaires, les promoteurs A et C seraient actifs, tandis que dans les cellules du tissu osseux, le promoteur F serait prédominant (Denger *et al.*, 2001; Grandien *et al.*, 1993). Étant donné la complexité de ce promoteur, il n'est pas surprenant que l'expression de ER $\alpha$  soit affectée par de nombreux facteurs, tels que AP-1 ou STAT5 (Pinzone *et al.*, 2004). Il est fort probable que les sites de liaison des facteurs de transcription responsables du contrôle de l'expression du gène *ESR1* soient localisés aux niveaux de ces promoteurs (Wilson *et al.*, 2009). Par exemple, GATA-3 se lie au niveau du



*Figure 24 : Organisation génomique de la région promotrice du gène ESR1 humain : promoteurs alternatifs*

Le promoteur du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  est constitué de multiples promoteurs en amont de l'Exon 1. L'activation de la transcription de ER $\alpha$  va donner naissance à 2 formes de récepteurs ER $\alpha$  après épissage alternatif : une forme majoritaire de 66kDa et une forme minoritaire de 46kDa. Seule la forme de 66kDa est prise en compte dans nos études. Les promoteurs sont illustrés avec des flèches. Les nombres sous les exons correspondent aux distances en paires de bases par rapport au TSS originellement décrit.

Adaptée de Kos *et al.*, 2001.

promoteur de ESR1 et est requis pour le recrutement de la RNA polymérase II (Eeckhoute *et al.*, 2007). Cependant, pour le moment, il n'y a que peu d'informations disponibles sur la composition moléculaire de ces éléments de régulation.

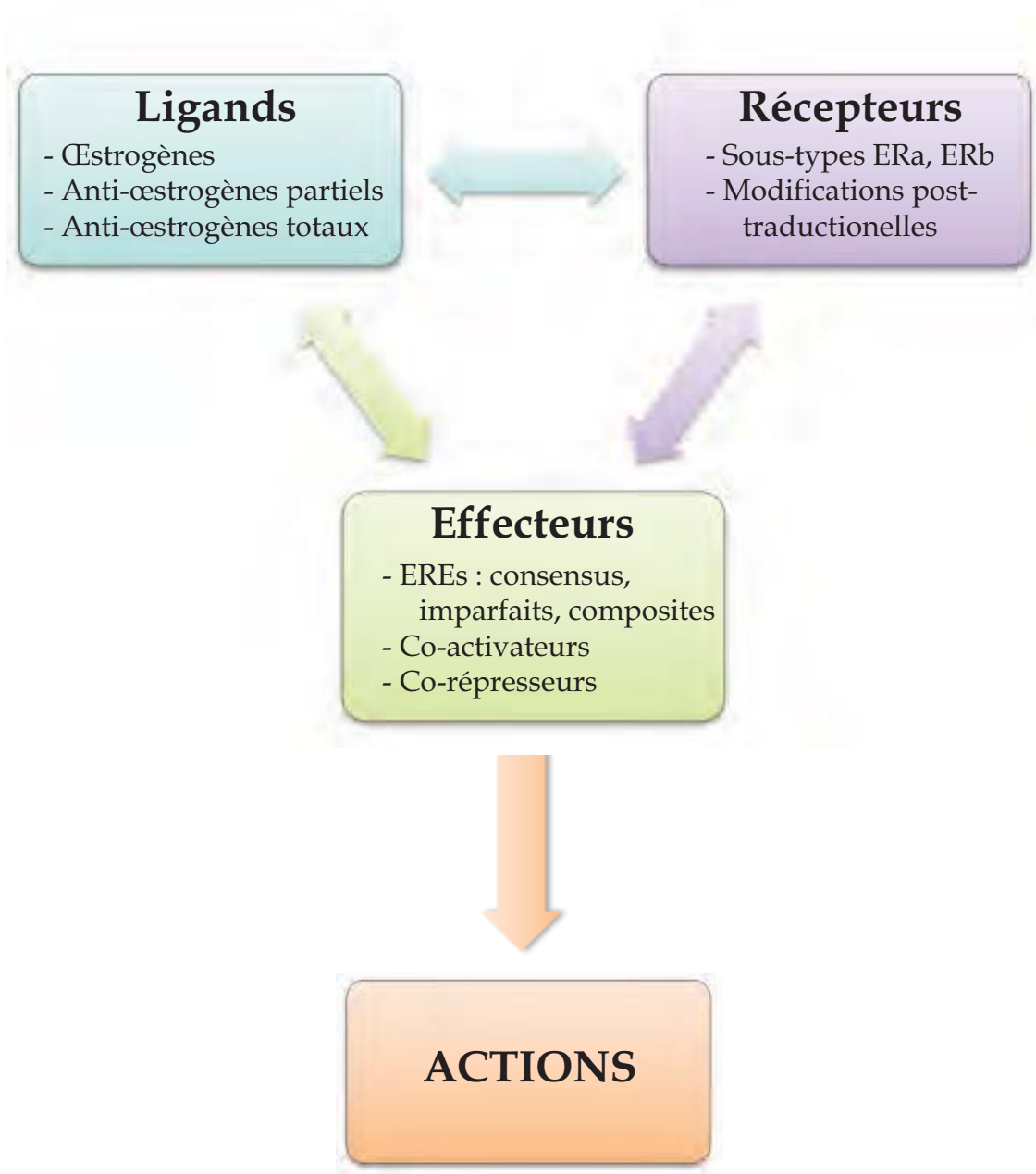
#### RÉGULATION ÉPIGÉNÉTIQUE DE L'EXPRESSION DE ER $\alpha$

---

La régulation épigénétique est un mécanisme primordial grâce auquel les cellules modulent l'expression de leurs gènes. L'expression de ER $\alpha$  est réduite par la méthylation de l'ADN dans de nombreux tissus, tels que le colon, les poumons, le cœur, la prostate ou encore les ovaires (Pinzone *et al.*, 2004). Ce phénomène est particulièrement étudié dans les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -négatives, car il est directement responsable de la perte de l'expression de ER $\alpha$ , mais il est également impliqué dans la résistance aux traitements anti-œstrogéniques dans des cellules ER $\alpha$ -positives. En effet, dans les cellules ER $\alpha$ -positives l'ADN du gène ESR1 n'est pas méthylé, contrairement aux cellules ER $\alpha$ -négatives. Ces dernières font preuve de beaucoup de méthylation, du fait d'une augmentation de l'activité de la DNMT1 (DNA methyltransferase 1), soit entre 5 et 10 fois (Issa *et al.*, 1996; Nan *et al.*, 1998; Ottaviano *et al.*, 1994). De plus, l'inhibition de l'enzyme DNMT1 provoque la déméthylation des îlots CpG de ESR1 induisant la réexpression de son ARNm et de sa protéine dans les cellules mammaires ER $\alpha$ -négatives MDA-MB-231 (Ferguson *et al.*, 1995). Il semblerait que le gène de ER $\beta$ , ESR2, soit régulé de la même manière, soit par la méthylation de son ADN, puisque l'hyperméthylation de son promoteur détecté dans le cancer de la prostate entraîne une réduction de son expression (Walton *et al.*, 2008). Plusieurs études mettent également en évidence l'implication d'histones désacétylases (HDACs) dans l'inhibition de la transcription de ESR1 par méthylation (Nakao, 2001). Depuis quelques années, les preuves s'accumulent pour démontrer l'implication des histones désacétylases (HDACs) dans l'expression de ER $\alpha$ . Ceci sera discuté plus avant dans le paragraphe 4. traitant des inhibiteurs des HDACs.

L'impact de différents facteurs tels que l'expression du récepteurs ER $\alpha$  ou encore la nature du ligand sur la cellule à travers les voies de signalisation des hormones stéroïdiennes, est résumé par le modèle tripartite présenté par l'équipe de Katzenellenbogen (Katzenellenbogen *et al.*, 1996) (figure 25). Trois groupes de facteurs influencent la pharmacologie du récepteurs des œstrogènes : (i) la nature du ligand, (ii) le type de récepteur avec lequel le ligand forme le complexe et (iii) l'interaction du complexe avec les EREs et les co-régulateurs. Au vue de l'implication des HDACs dans la voie des œstrogènes, leurs inhibiteurs, les HDACis, pourraient agir au niveau des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$ , par la modulation de leur expression ou de leur acétylation, comme au niveau des effecteurs.





*Figure 25 : Pharmacologie tripartite des récepteurs des œstrogènes*

Le diagramme reflète le fait que l'action des récepteurs des œstrogènes dépend de trois facteurs : les ligands, les récepteurs et les effecteurs. Ils déterminent la magnitude et le caractère transcriptionnel ou non de la réponse aux œstrogènes dans leur tissus cibles. Les ligands peuvent être des agonistes ou des antagonistes partiels ou totaux. En fonction de ces derniers et du récepteur, ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , les effecteurs ne seront pas les mêmes.

Adaptée de Katzenellenbogen *et al.*, 2000.

#### 4. VERS DE NOUVEAUX TRAITEMENTS ANTI-TUMORAUX : LES INHIBITEURS DES HISTONES DÉACÉTYLASES

Depuis une dizaine d'années, la recherche de nouveaux traitements anti-tumoraux s'est orientée vers l'étude et le développement d'agents thérapeutiques ciblant les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse. Ceci n'a été permis qu'à travers une meilleure compréhension de ces mécanismes. L'altération de six processus définit une cellule tumorale : (1) indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération cellulaire, (2) insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance cellulaire, (3) éviction de l'apoptose, (4) capacité proliférative illimitée, (5) induction de l'angiogenèse, (6) acquisition de capacité invasive et métastatique (figure 9) (Hanahan *et al.*, 2000). Le but d'augmenter la sélectivité des traitements pour les tumeurs est d'en augmenter l'efficacité tout en réduisant leur caractère toxique pour les cellules normales, afin de prolonger la survie des patients tout en augmentant leur qualité de vie. Le fait de pouvoir cibler des molécules clés du processus tumoral, tel que l'Herceptin cible le récepteur HER-2 dans le cancer du sein, fut une révolution.

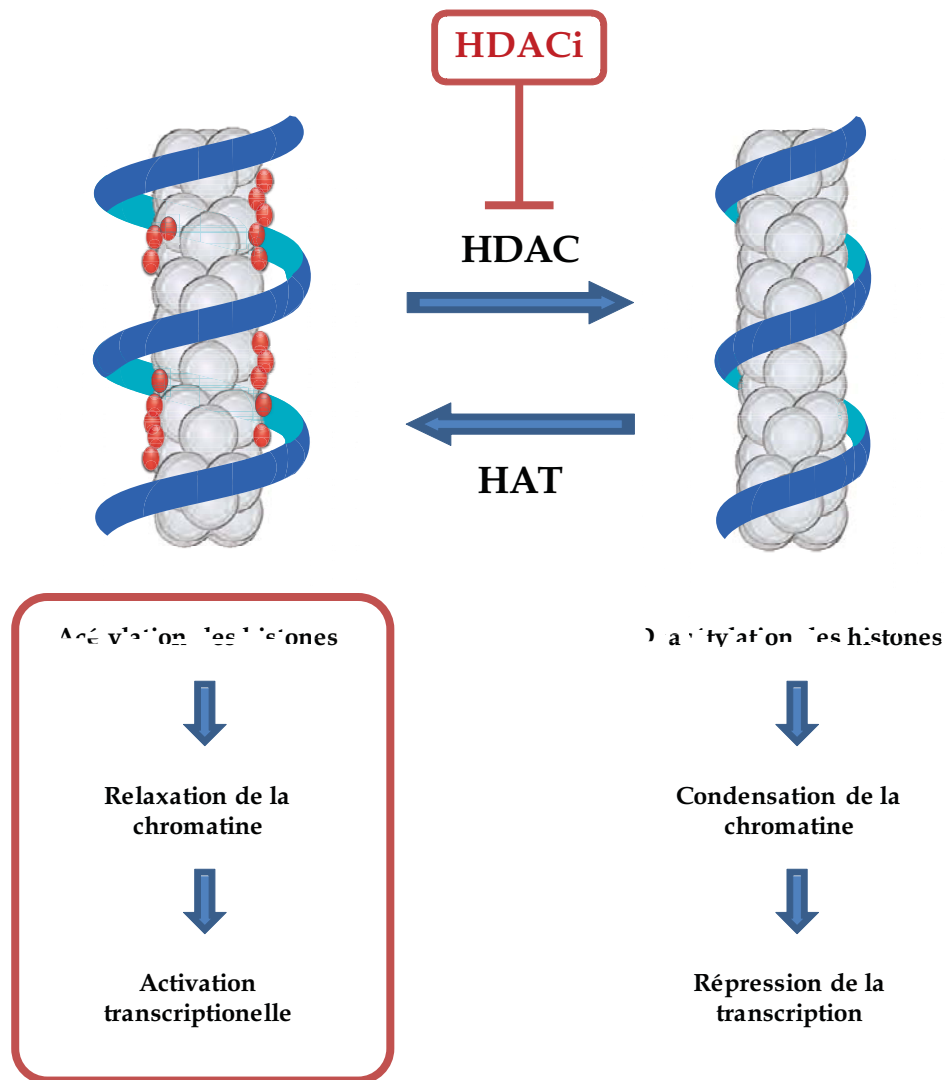
Les recherches actuelles sur les inhibiteurs des HDACs (histones désacétylases) ou HDACis s'inscrivent dans ce mouvement. En effet, la mise en évidence des altérations épigénétiques dans le cancer du sein a ouvert la porte aux agents modulant la condensation de la chromatine comme traitement anti-tumoraux. Parmi eux, les HDACis connaissent un essor fulgurant depuis ces dernières années. Mais avant de comprendre la raison ce phénomène, il est nécessaire de comprendre le rôle des HDACs et leur impact sur les phénomènes cancéreux.

#### 4.1. LES PRÉSENTATIONS : CLASSIFICATION DES HDACS

Les premières HDACs ont été identifiées au milieu des années 1990 (Yang *et al.*, 2007). La famille des histones désacétylases (HDACs) de mammifères comporte 18 membres. Ces enzymes forment quatre classes en fonction de leur homologie avec les protéines désacétylases de levure, leur localisation subcellulaire et leur activité enzymatique (Thiagalingam *et al.*, 2003). Les HDACs de la classe I (HDAC1, -2, -3 et -8) sont ubiquitaires et principalement localisées dans le noyau à l'exception de HDAC3 (figure 26). Par contre, les HDACs des classes II et IV voient leur expression restreinte à certains tissus. Les enzymes de la classe II sont subdivisées en deux groupes : les membres de classe IIa (HDAC4, -5, -7 et -9) se déplacent entre le noyau et le cytoplasme ; tandis que les HDACs de classe IIb (HDAC6 et -10) sont cytoplasmiques. La classe IV ne compte qu'un seul membre : HDAC11 qui n'est pas encore suffisamment caractérisé pour être classé parmi les enzymes de la classe I ou II, même si son site catalytique partage des similarités de séquence avec elles (Gao *et al.*, 2002). Les enzymes des classes I, II et IV sont des HDACs zinc-dépendantes, contrairement à celles de la classes III (SIRT1-7), qui requièrent le NAD<sup>+</sup> pour leur activité de régulation génique en réponse au statut redox de la cellule.

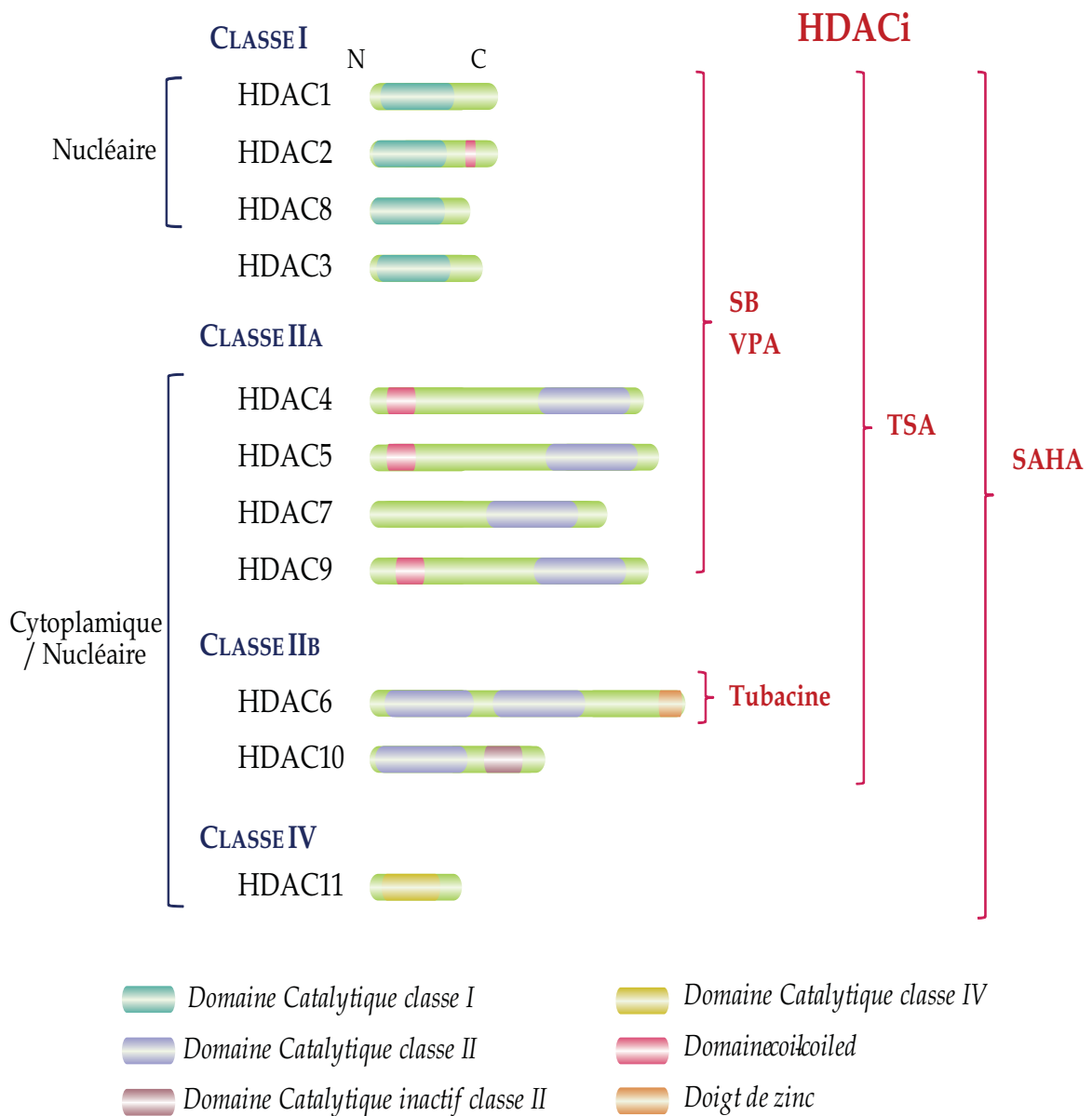
#### 4.2. RÔLES DES HDACS

Au cours des années 1970, les propriétés différenciatrices du sodium butyrate (SB) ont été mise en évidence dans des cellules tumorales (Leder *et al.*, 1975; Sato *et al.*, 1971), de même qu'une accumulation d'histones hyperacétylés (Lane *et al.*, 2009; Riggs *et al.*, 1977). Il fallu attendre les années 1990 pour que l'hyperacétylation des histones soit mise en relation avec l'inactivation du chromosome X par « gene silencing » (Jeppesen *et al.*, 1993). Alors, l'hyperacétylation des histones, la décompaction de la chromatine et l'augmentation de la liaison des facteurs de transcription furent liées (Lee *et al.*, 1993). Finalement, quelques années plus tard, les



*Figure 27 : Modulation de la transcription par la balance des activités HAT et HDAC*

L'équilibre des activités des enzymes HATs et HDACs définit le niveau de compaction de la chormatine. L'acétylation des queues des histones par les HATs augmente la relaxation de la chromatine, favorable à la transcription des gènes, car l'ADN est alors accessible à la machine transcriptionnelle. A l'inverse les HDACs, déacétylent les queues des histones, augmentant ainsi les interactions entre l'ADN et les histones qui condense la chromatine et défavorise la transcription. Théoriquement, l'inhibition des HDACs par les HDACis déplace l'équilibre vers des histones plus acétylés, une chromatine plus relachée donc une augmentation de l'activité transcriptionnelle.



**Figure 26 : Membres de la famille des HDACs : organisation, localisation et principaux inhibiteurs**

Les HDACs sont répartis en 4 classes distinctes, en fonction de leur domaines catalytiques. Leur localisation, nucléaire ou cytoplasmique, est indiqué à gauche; tandis que leurs inhibiteurs, les HDACis, sont représentés à droite, en rouge.

premières HDACs de mammifères furent clonées sur la base de leur liaison avec des petites molécules capables d'inhiber la Désacétylation des histones (Taunton *et al.*, 1996). Leurs gènes étant des homologues de répresseurs de la transcription chez la Levure, le rôle des histones désacétylases comme suppresseur de l'expression des gènes fut compris.

#### 4.2.1. HDACs, HISTONES ET TRANSCRIPTION

Les histones ayant été les premières cibles des désacétylases identifiées, ces enzymes ont été nommées « histone désacétylases ». L'acétylation réversible des lysines des queues amino-terminales des histones est une modification épigénétique impliquée dans la régulation de l'expression génique. Mise en évidence il y a plus de 50 ans (Mahlknecht *et al.*, 2000), l'implication de l'hyperacétylation de la queue des histones dans l'activation transcriptionnelle, n'a pu être clairement démontrée qu'en 2001 (Allfrey *et al.*, 1964; Ameyra-Zazoua *et al.*, 2006; Marmorstein *et al.*, 2001). Le niveau d'acétylation des histones est très dynamique et finement régulé par les activités opposées des HDACs et des HATs (histone acétylase transférase) (figure 27) (Glozak *et al.*, 2005). L'acétylation des queues des histones par les HATs résulte en une expansion locale de la structure de la chromatine et augmente ainsi l'accessibilité de l'ADN aux protéines régulatrices. Les HDACs catalysent le détachement des groupes acétyles menant à la condensation de la chromatine et à la répression transcriptionnelle. Le contrôle de la transcription des gènes confère aux HDACs un impact sur un grand nombre de processus cellulaires, comme la prolifération cellulaire, la différenciation des cellules et l'apoptose (Tableau V) (Stimson *et al.*, 2009). Ces enzymes agissent au sein de larges complexes protéiques et sont fréquemment associées avec des co-répresseurs, tels que NCoR ou SMRT (Inche *et al.*, 2006). Néanmoins, les effets des HDACs sur les histones seuls ne suffisent pas à expliquer l'impact de leur inhibition, faisant naître l'hypothèse qu'ils n'agissent pas seulement sur les histones, mais aussi sur d'autres protéines cellulaires.

**Tableau V: Implication des HDACs des classes I, II et IV dans les processus cellulaires et leur expression dans les cancers (Bolden, 2006 ; Stimson, 2009)**

<b>Classe</b>	<b>Nom</b>	<b>Processus</b>	<b>Surexpression dans les cancers</b>
<b>I</b>	HDAC1	Prolifération cellulaire	sein, prostate, colorectal et gastrique
<b>I</b>	HDAC2	Prolifération cellulaire Apoptose	Colorectal, cervical, gastrique
<b>I</b>	HDAC3	Prolifération cellulaire	Colorectal
<b>IIa</b>	HDAC4	Différenciation	
<b>IIa</b>	HDAC5	Différenciation	
		Agit sur tubuline	
		Viabilité cellulaire	
<b>IIb</b>	HDAC6	Module l'activité des protéines chaperonnes Différenciation?	Sein et spino-cellulaires oraux
<b>IIa</b>	HDAC7	Différenciation Apoptose	
<b>I</b>	HDAC8	Prolifération cellulaire	
<b>IIa</b>	HDAC9	Différenciation	
<b>IIb</b>	HDAC10	Différenciation?	
<b>IV</b>	HDAC11		

#### 4.2.2. AUTRES SUBSTRATS, AUTRES RÔLES DES HDACs

L'activité des HDACs ne se limite pas seulement aux histones, de plus en plus de protéines non-histones sont identifiées comme substrats de ces dernières. Parmi ces protéines sujettes à l'acétylation réversible par les HATs/HDACs, se retrouvent des facteurs de la transcription, les récepteurs hormonaux, des « transducteurs de signaux », des chaperonnes et des protéines du cytosquelette (Buchwald *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008). Par exemple, les HDACs altèrent les fonctions des facteurs de transcription p53 (Gu *et al.*, 1997), E2Fs (Martinez-Balbas *et al.*, 2000), c-myc (Patel *et al.*, 2004), NFκB (Chen *et al.*, 2001), AR (Gaughan *et al.*, 2002) et ERα (Wang *et al.*, 2001); ou encore de la protéine de réparation de l'ADN Ku70 (Cohen *et al.*, 2004), de la chaperonne Hsp90 (Kovacs *et al.*, 2005), de la molécule de signalisation STAT3 (Yuan *et al.*, 2005), des molécules pro-apoptotiques Bmf et Bim (Zhang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2005) et enfin de l'α-tubuline (Zhang *et al.*, 2003). L'acétylation de ces protéines module ainsi une large variété de processus cellulaires tels que la prolifération des cellules, la survie cellulaire ou encore l'apoptose (figure 28) (Buchwald *et al.*, 2009; Spange *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2007). Cette acétylation module leurs fonctions en modifiant leur stabilité, leur localisation cellulaire ou les interactions qu'elles peuvent mettre en place. Par exemple, l'acétylation de plusieurs lysines de p53 par diverses HDACs module son activité, empêche son export du noyau et le protège également de la dégradation protéasomale en empêchant l'ubiquitination de la lysine acétylée (Li *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2008). Ainsi, l'acétylation peut également interférer avec d'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination ou la phosphorylation (Buchwald *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Mujtaba *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2008). L'acétylation de STAT3 va quant à elle permettre la création d'un site de liaison de co-activateurs transcriptionnels, affecter son hétéro- ou homodimérisation, sa localisation cellulaire et son influence sur la voie de signalisation NFκB (Buchwald *et al.*, 2009; Nadiminty *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2005). La modulation de l'acétylation de nombreuses protéines autres que les histones par le couple HATs/HDACs leur



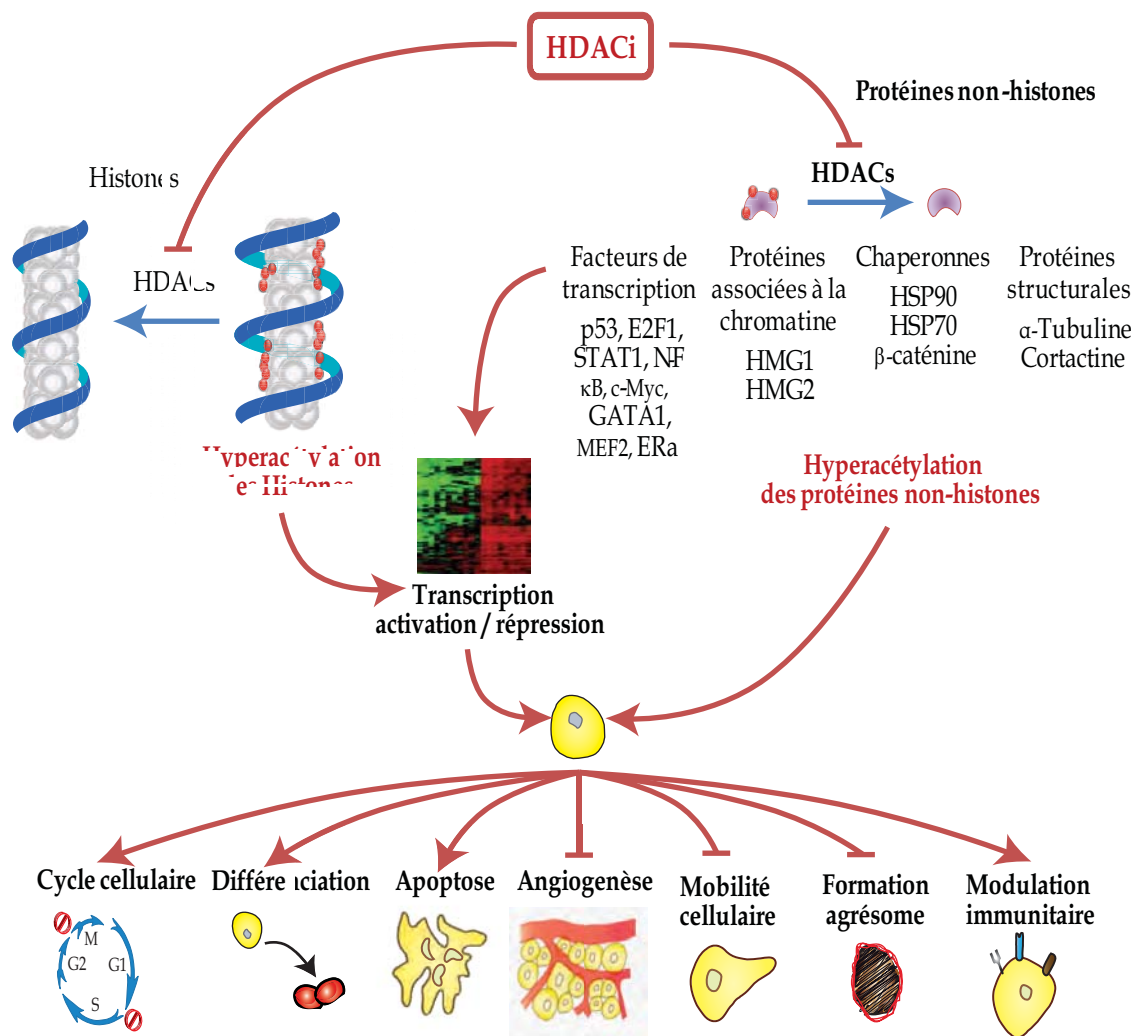


Figure 28 : Effets de l'inhibition des HDACs par les HDACis

Les HDACs déacétylent les histones aussi bien que d'autres protéines associées à la chromatines, des facteurs de transcription, des protéines chaperonnes ou encore des protéines structurales. De part cette double influence des HDACs, les HDACis vont directement affecter la transcription des gènes mais aussi l'activité de nombreuses protéines, et ainsi avoir un impact sur un grand nombre de processus cellulaires majeurs.

confèrent un impact sur de nombreux processus biologiques, pouvant être impliqués dans la carcinogenèse (figure 28)(Tableau V).

### 4.3. LES HDACs COMME CIBLES DES TRAITEMENT ANTI-TUMORAUX

Le cancer est considéré comme une maladie génétique reposant sur des mutations ou des délétions de gènes provoquant des pertes de fonction de gènes suppresseurs de tumeur et/ou des gains de fonction d'oncogènes. Cependant, il a récemment été démontré que les changements épigénétiques sont également cruciaux pour l'émergence et la progression des tumeurs (Baylin *et al.*, 2006; Bolden *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2004). En effet, la balance des activités des HATs et HDACs s'avère dérégulée dans les cancers, mettant en valeur l'implication de l'acétylation des protéines dans la transformation cellulaire et le développement des cancers. Par exemple, CBP/p300 (protéine à activité HAT) est une protéine dont l'inactivation est liée à la formation de cancer (Iyer *et al.*, 2004). Elle est très fréquemment mutée dans les lignées de cellules tumorales (Iyer *et al.*, 2004), les leucémies (Santos-Rosa *et al.*, 2005), et les cancers, tels que les cancers du sein, colorectal, ovarien et gastrique (Iyer *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2009). Peu de mutations des gènes codant pour des HDACs sont retrouvées dans les cellules tumorales. Par contre, elles voient leur expression modifiée dans différents types de tumeurs, par exemple, HDAC1 et HDAC6 sont sur-exprimées dans le cancer du sein (Zhang *et al.*, 2005) (Tableau V). De plus, la surexpression des HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC6 a été identifiée dans les cancers colorectal, de la prostate, de la thyroïde, cervicale et gastrique (Bolden *et al.*, 2006; Lafon-Hughes *et al.*, 2008). A cette augmentation de l'activité HDAC dans les tumeurs correspond une hypoacétylation des histones comparée à leurs tissus sains respectifs (Atmaca *et al.*, 2007; Camacho *et al.*, 2007; Kummar *et al.*, 2007). De plus, des siRNA dirigées contre une de ces HDACs supprime la croissance des cellules tumorales (Glaser *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Wilson *et*

*al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2004). Ceci confirme l'implication des HDACs dans la carcinogénèse et en fait des cibles attrayantes pour les traitements anti-tumoraux.

## 4.4. LES HDACIS COMME AGENTS ANTI-TUMORAUX

### 4.4.1. HISTOIRE RÉCENTE DES HDACIS COMME ANTI-TUMORAUX

Les HDACis possèdent déjà une longue histoire en psychiatrie. Ils sont depuis longtemps utilisés comme anti-épileptiques et stabilisateurs d'humeur. Par exemple l'acide valproïque (VPA) est administré depuis plus de trente ans sous le nom de Depakine®, anti-épileptique numéro 1 en Europe dans les années 1990. C'est justement au milieu des années 1990 que le lien entre les HDACis et la suppression de la croissance des tumeurs fut clairement établie (Bolden *et al.*, 2006; Richon *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1990). L'implication des HDACs dans la tumorigénèse a fait naître un attrait grandissant pour ses inhibiteurs. Un des éléments fondateurs de la famille principale des HDACis, les acides hydroxamiques, est la TSA (Trichostatine A), une molécule antibiotique naturelle produite par *Streptomyces hygroscopicus* (Tsuji *et al.*, 1976). Au cours de ces dernières années, le nombre de programmes de recherche visant à découvrir de nouveaux HDACis a explosé. L'utilisation de techniques allant du design rationnel de drogue à du criblage à haut volume ont permis l'identification de nombreux composés HDACis de classes chimiques très différentes. Les principales classes de HDACis, des exemples de composés, leur spécificité et l'ordre de grandeur de leur IC50 sont représentés dans le Tableau VI ; leur structure, dans le Tableau VII. Il existe aujourd'hui plus d'une vingtaine de HDACi et tous les mois de nouvelles publications font état de la découverte d'autres composés.

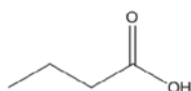
**Tableau VI : Spécificité d'action des membres des différentes classes de HDACis et leurs progressions dans les essais cliniques.**

<i>Classe</i>	<b>Composés</b>	<b>IC50</b>	<b>Spécificité</b>	<b>Essais cliniques</b>	
<i>Acide gras à chaînes courtes</i>	Sodium Butyrate (SB)	mM	Classe I, IIa	Phase I, II	
	Acide valproïque (VPA)	mM	Classe I, IIa	Phase I, II	
	AN-9	µM	ND	Phase I, II	
<i>Acides Hydroxamiques</i>	- Trichostatine A (TSA)	nM	Classe I, II	-	
	<b>Acide hydroxamique Suberoxylanilide (SAHA)</b>	µM	Classe I, II, IV	FDA (CTCL)	
	PXD101 - Belinostat	µM	Classe I,II, IV	Phase I, II	
	- Oxamflatine	nM	Classe I, II	ND	
	- LAQ824	nM	Classe I, II	Phase I	
	LBH589 - Panobinostat	nM	Classe I,II, IV	Phase I,II	
	- Acide M-Carboxycinnamique Bishydroxamique (CBHA)	µM	ND	Phase I, II,III	
	- Scriptaïde	µM	Classe I	Phase I	
	- Tubacine	µM	HDAC 6	ND	
	- SK-7068	nM	HDAC1 et 2	ND	
	- SK-7041	nM	Classe I, II	Phase I, II	
	- PCI-24781		I, IIb	Phase I	
	<i>Tétrapeptides cycliques</i>	- <b>Depsipetide (FK 228)</b>	nM	HDAC 1, 2, 4, 6	Phase I, II
		- Trapoxine A	nM	Classe I, IIa	ND
- Apicidine		nM	Classe I, II	ND	
- CHAP		nM	Classe I	ND	
<i>Benzamides</i>	- MS-275	µM	HDAC 1 2 3 9	Phase I, II	
	- N-acétyldinaline (CI-994)	µM	ND	Phase I, II,III	

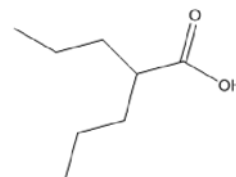
**Tableau VII : Structure de quelques HDACis.**

**Acide gras à chaînes courtes**

Sodium butyrate

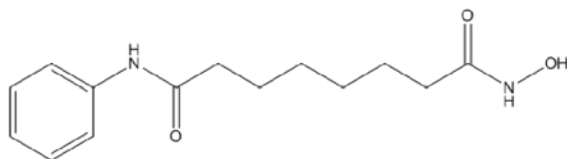


Acide Valproïque

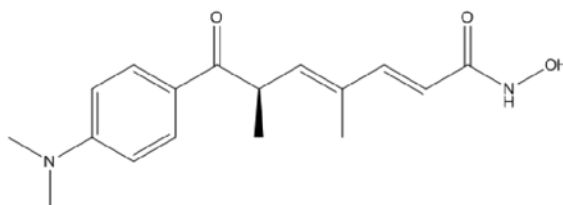


**Acides Hydroxamiques**

Trichostatine A

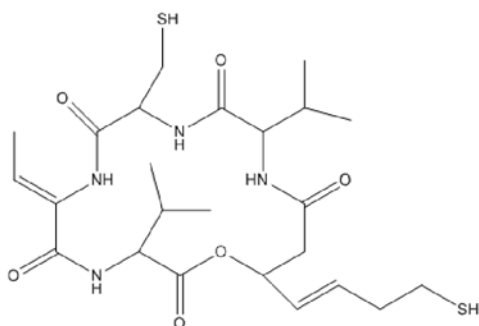


Acide hydroxamique suberoxylanilide



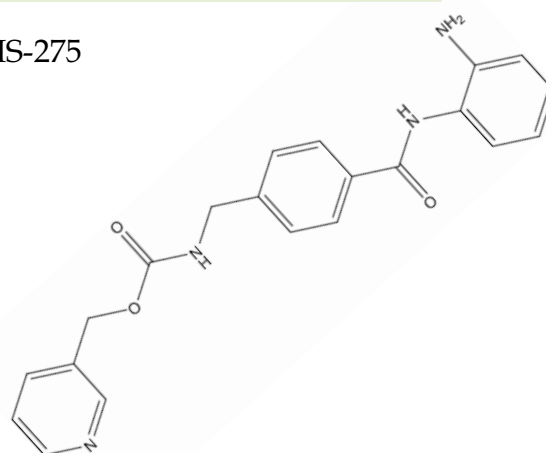
**Tétrapeptides cycliques**

Depsipetide



**Benzamides**

MS-275



#### 4.4.2. LES HDACIS ET LES MILLE ET UNS ESSAIS CLINIQUES

Depuis leur avènement, les HDACis sont impliqués dans de très nombreux essais cliniques, comme le révèlent les données du Tableau VI. Par exemple, SAHA (Acide hydroxamique suberoxylanilide), le fer de lance des HDACis, est testé dans plus d'une dizaine d'essais cliniques, seul ou en combinaison avec d'autres agents anti-tumoraux, pour le traitement de cancers solides aussi bien qu'hématologiques (Batty *et al.*, 2009). SAHA est, depuis 2006, le seul HDACi approuvé par la FDA pour le traitement des lymphomes cutanés des cellules T (CTCL) en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne de traitement, sous le nom de Vorinostat® (Grant *et al.*, 2007; Stimson *et al.*, 2009). Dans la plupart des cas, les HDACis démontrent des propriétés anti-tumorales. De plus, comparativement aux traitements chimio-thérapeutiques anti-tumoraux couramment utilisés, les HDACis sont très bien tolérés par la majorité des patients. Leurs effets toxiques engendrent fatigue, nausée, diarrhée, faible myélo-suppression, anémie (Mann *et al.*, 2007). Quelques rares cas de problèmes cardiaques ont été rencontrés, mais semblent se limiter au FK228 (Shah *et al.*, 2006). Aucune toxicité cardiaque n'a été rapportée avec SAHA.

Néanmoins, pour le moment, les résultats des essais cliniques avec des HDACis mettent en évidence, qu'en tant qu'agent seul, leurs effets sont limités dans les tumeurs solides (Blumenschein *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008; Modesitt *et al.*, 2008; Vansteenkiste *et al.*, 2008). Par exemple, lors d'une étude de phase II avec SAHA, enrôlant 27 patientes présentant un cancer ovarien ou un carcinome péritonéale primaire, seuls les cancers de deux d'entre elles n'ont pas progressé après six mois et une présentait une réponse partielle (Lane *et al.*, 2009; Modesitt *et al.*, 2008). D'autres essais cliniques de phase I réalisés avec le FK228 ou Depsipetide seuls ont échoué à démontrer un effet de ce HDACi pour le traitement de cancers réfractaires aux autres traitements, dont des leucémies myéloïdes, leucémies lymphocytaires chroniques, des cancers des poumons et des reins (Byrd *et al.*, 2005; Fouladi *et al.*, 2006; Klimek *et al.*, 2008; Lane *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 2006). Dans un autre essai clinique de phase II, toujours avec le FK228, comme agent seul, 14%

des patients avec un cancer de la prostate montraient un contrôle de la maladie à court terme (Lane *et al.*, 2009).

Par ailleurs, l'association de HDACis avec d'autres agents anti-tumoraux démontre des résultats très prometteurs (Marchion *et al.*, 2007) (U.S. National Institutes of Health, 2010). Jusqu'à aujourd'hui, il a été établie que les HDACis coopèrent avec de nombreux agent anti-tumoraux, dont des agents cytotoxiques, comme le gemcitabine, paclitaxèle, cisplatine, etoposide et doxorubicine ou encore des agents sélectifs, tels que des inhibiteurs de Hsp90 (17AA-G), du protéasome (bortezomibe), et de la méthylation de l'ADN (5-azacytidine) (Stimson *et al.*, 2009). Par exemple, une étude de phase I combinant SAHA avec du carplatin et du paclitaxel dans des cancers solides avancés présentent déjà des résultats encourageant (Ramalingam *et al.*, 2007). Onze des 25 patients enrôlés présentent une réponse partielle. Il semblerait que le métabolisme de SAHA soit ralenti par la combinaison, alors que la pharmacocinétique du paclitaxel reste inchangée. Il est intéressant de noter que malgré une courte demi-vie, du fait du métabolisme hépatique, les HDACis démontrent encore des effets après leur temps de métabolisme théorique (Kelly *et al.*, 2005). Dans le cadre du cancer du sein, un essai clinique de phase II utilisant du SAHA combiné à du Tamoxifène© présente 21% de réponse et 33% de stabilisation de la maladie, comparativement à 10% de réponse avec le Tamoxifène© seul et aucune réponse au SAHA comme agent seul (Thomas *et al.*, 2009).

Malgré l'implication des HDACis dans de très nombreux essais cliniques, les mécanismes sous-jacents de leurs effets cytotoxiques ne sont pas encore bien compris.

## 4.5. MODE D'ACTION DES HDACIS

### 4.5.1. MÉCANISME D'ACTION GÉNÉRAL DES HDACIS

Parmi la quinzaine de HDACis étudiés, tous partagent le même mécanisme d'action de base : ils entrent dans la poche catalytique des HDACs et lient l'ion  $Zn^{2+}$ , indispensable à l'activité de ces enzymes, les inactivant de manière réversible (Finnin *et al.*, 1999). La co-cristallisation de TSA et SAHA avec une HDAC bactérienne a permis de mettre ce mode d'action en évidence (Itazaki *et al.*, 1990). De part leur mode d'action, les HDACis, tels que SAHA, TSA ou SB, n'inhibent pas les HDACs de classe III ou sirtuines (Imai *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Néanmoins, ils présentent des sélectivités d'inhibition spécifiques, leurs activités varient grandement d'une HDAC à une autre (Beckers *et al.*, 2007), même s'ils présentent tous des propriétés anti-tumorales *in vitro* et *in vivo* (Glaser, 2007) (Tableau VI). La plupart d'entre eux inhibent les HDACs des classes I et II.

De part l'impact des HDACs sur les histones, mais également sur de nombreuses protéines non-histones, les HDACis agissent sur de nombreuses voies de signalisation (figure 28). Leur effet hyperacétylateur des queues des histones a d'abord laissé croire qu'ils potentialisaient l'expression globale des gènes. Cependant, de façon surprenante, l'analyse du transcriptome à l'échelle du génome montre que seul un faible pourcentage de gènes (entre 2% et 5%) sont influencés par l'inhibition des HDACs (Glaser *et al.*, 2003; Johnstone *et al.*, 2003; Mitsiades *et al.*, 2004; Stimson *et al.*, 2009). Ceci insiste sur le fait que l'activité des HDACs ne se limite pas à moduler l'accessibilité de la chromatine, mais qu'elle régule également le niveau d'acétylation de protéines non-histones, dont les activités vont être à leur tour modulées par les HDACi.

Globalement, les HDACis modulent l'expression génique, induisent la différenciation des cellules et la mort cellulaire ou l'apoptose, bloquent le cycle cellulaire, inhibent l'angiogenèse et les phénomènes métastatiques (figure 28). Les



activités anti-tumorales des HDACis, tels que SAHA, TSA, VPA ou encore SB, sont largement démontrées dans de nombreux modèles expérimentaux de cancers. Par exemple, ils bloquent la prolifération des cellules tumorales mammaires, de l'endomètre et de l'utérus (Kelly *et al.*, 2002). De manière très intéressante, les cellules transformées sont plus sensibles que les cellules normales aux HDACis. Par exemple, alors que SAHA bloque la prolifération des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*, il est peu ou pas toxique dans les cellules normales (Duvic *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2002). De la même manière, dans des modèles de rongeurs présentant des cancers hématologiques ou solides (dont des cancers du sein), SAHA est sélectivement toxique pour les cellules transformées, dans lesquelles il induit de la mort cellulaire, par contre les cellules normales restent viables, seulement en arrêt de croissance (Marks, 2007; Thomas *et al.*, 2009).

Au départ, les propriétés anti-tumorales du HDACi sodium butyrate semblait reposer sur ses capacités à induire la différenciation cellulaire (Leder *et al.*, 1975).

#### 4.5.2. LES HDACIS COMME INDUCTEURS D' APOPTOSE

Les HDACis peuvent activer les voies apoptotiques extrinsèques, via les récepteurs de mort cellulaire, aussi bien que les voies intrinsèques ou mitochondriales. Par exemple, dans de nombreuses cellules transformées, les HDACis activent la transcription des récepteurs FAS, DR5 et de leurs ligands TRAIL ou FAS-L (Insinga *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2009). Par ailleurs, ils vont agir sur la voie apoptotique intrinsèque en inactivant les molécules anti-apoptotiques et en activant les molécules pro-apoptotiques (Bolden *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, notamment, sont réprimées par LBH589 ou panobinostat dans une lignée de cellules de cancer du poumon (Edwards *et al.*, 2007). A l'inverse, les molécules pro-apoptotiques Bak, Bik ou Bim, voient leur expression augmentée par les HDACis (dont SAHA) au niveau ribonucléique et protéique (Bolden *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2007).

#### 4.5.3. LES HDACIS COMME INHIBITEURS DU CYCLE CELLULAIRE

La quasi-totalité des HDACis inhibe la prolifération des cellules par un blocage de leur cycle cellulaire en G1 ou G2/M, en fonction des types cellulaires et des doses utilisées (Cheng *et al.*, 2007; Komatsu *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009; Noh *et al.*, 2003; Qian *et al.*, 2008; Rosato *et al.*, 2006). Ceci pourrait reposer sur l'augmentation de la transcription de p21, très fréquemment rapportée dans les lignées de cellules tumorales en réponse aux HDACis, et/ou pourrait également impliquer la répression de l'expression de cyclines telles que la cyclines D1 (Alao *et al.*, 2006; Gui *et al.*, 2004; Sakajiri *et al.*, 2005).

#### 4.5.4. PROPRIÉTÉS ANTI-ANGIOGÉNIQUES ET ANTI-MÉTASTATIQUES DES HDACIS

Les propriétés anti-angiogéniques et anti-métastatiques des HDACis ont été récemment mises en évidence *in vitro* et *in vivo*. Elles pourraient reposer sur la réduction de l'expression de gènes, tels que HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), CXCR4 (CXC chemokine receptor), TIMP-1 (tissue inhibitor of metallo-proteinases) et en parallèle l'augmentation de l'expression des gènes de TSP1 (thrombospondin), NF2 (neurofibromin) et MMPs (matrix metallo-proteinases), par exemple (Kim *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2009; Petrella *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2006).

#### 4.5.5. IMPACT DES HDACIS SUR LE SYSTÈME OSSEUX

L'utilisation des HDACis comme traitements anti-tumoraux devrait s'accompagner d'une surveillance de la densité osseuse. En effet, de nombreuses publications font état du rôle des HDACs dans le développement et la maintenance du tissu osseux (Jensen *et al.*, 2007; McGee-Lawrence *et al.*, 2011). McGee *et al.* ont récemment démontré que SAHA réduit le nombre d'ostéoblastes des souris mâles

C57BL/6J, tout en augmentant l'activité de ceux existants. De plus, SAHA induit des lésions de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules stromales de la moëlle osseuse, supprimant ainsi la formation de colonies ostéogénique *in vivo*, mettant encore plus en évidence l'impact délétère de SAHA sur les progéniteurs osseux métaboliquement actifs (McGee-Lawrence *et al.*, 2011).

#### 4.5.6. IMPACT DE LA MODULATION DE L'ACÉTYLATION DES PROTÉINES CYTOPLASMIQUES

L'hyperacétylation induite de protéines, telles que Hsp-90, Ku-70,  $\alpha$ -tubuline ou  $\beta$ -caténine, par les HDACis a pour effet d'inhiber leur activité. Ainsi, les HDACis, comme TSA ou SAHA, inhibent l'activité de Ku70, protéine réparatrice de l'ADN, en diminuant son affinité pour l'ADN et réduisent ainsi la capacité de cellules de cancer de la prostate à réparer des dommages à l'ADN induits par d'autres drogues (Chen *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2009). Ceci pourrait expliquer les effets coopératifs ou synergiques observés entre les HDACis et les radiations ionisantes, par exemple. De la même manière, l'inhibition de l' $\alpha$ -tubuline (substrat connu de HDAC6 et impliquée dans la motilité des cellules) par TSA ou la tubacine par un mécanisme d'hyper-acétylation, diminue la motilité des cellules de carcinome et suggère des propriétés anti-métastatiques aux HDACis (Haggarty *et al.*, 2003; Hubbert *et al.*, 2002). Une autre cible de HDAC6, la protéine chaperonne Hsp90, est elle aussi inhibée par l'augmentation de son acétylation en présence de HDACi. Elle ne peut alors plus remplir ses fonctions de protéines chaperonne avec des protéines tels que ER $\alpha$ , EGFR ou encore STAT3. Ceci provoque un arrêt de leur croissance des cellules tumorales mammaires ou pulmonaires (Edwards *et al.*, 2007; Fiskus *et al.*, 2007). L'activité des facteurs de transcription, tel ER $\alpha$ , est également directement modulée par acétylation.

#### 4.5.7. IMPACT DE LA MODULATION DE L'ACÉTYLATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

Les nombreux effets des HDACis sur l'expression des gènes résultent en partie de l'acétylation de facteurs de transcription, tels que p53, E2F ou ER $\alpha$ . Par exemple, l'acétylation de p53 augmente sa stabilité et son activité (Ito *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2009), menant à l'induction de la transcription de p21 dans des cellules tumorales de la prostate (Roy *et al.*, 2007). De la même manière, l'acétylation des E2F par CBP/p300 les active, tandis que leur Désacétylation par les HDACs associé à Rb les inhibe (Martinez-Balbas *et al.*, 2000). Les effets de l'hyper-acétylation du récepteur hormonal et facteur de transcription ER $\alpha$  sont moins clairs (cf. paragraphe 4.6.1).

### 4.6. HDACIS ET VOIE DE SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES

Les HDACis affectent la croissance des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -négatives aussi bien que celle des cellules ER $\alpha$ -positives, en mettant en place des mécanismes différents. Le traitement des cellules ER $\alpha$ -négatives par des fortes doses de HDACis leur confère une sensibilité aux anti-œstrogènes. Tandis que le traitement des cellules ER $\alpha$ -positives par des doses similaires de HDACis va inhiber la voie de signalisation des œstrogènes. Ainsi les HDACis jouent un rôle complexe sur la voie de transcription des œstrogènes.

#### 4.6.1. EFFETS DE L'ACÉTYLATION DE ER $\alpha$

Plusieurs études réalisées dans des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -négatives sur-exprimant le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  de manière exogène mettent en évidence l'effet de l'acétylation du récepteur. Globalement, l'acétylation des lysines de ER $\alpha$  augmente sa sensibilité aux œstrogènes, sa stabilité et sa

transactivation des gènes cibles des œstrogènes (Braitheh *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001).

L'impact des HDACis sur les niveaux d'acétylation des récepteurs des œstrogènes et la modulation de leur activité n'est pas clairement établi, par contre leur influence sur la sensibilité des cellules ER $\alpha$ -négatives aux anti-œstrogènes a fait l'objet de nombreuses études.

#### 4.6.2. EFFETS DES HDACIS DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES ER $\alpha$ -NÉGATIVES : SENSIBILISATION AUX ANTI-ŒSTROGÈNES

Les HDACis ont été largement utilisés dans les recherches pour renverser le développement de résistance aux thérapies anti-œstrogéniques.

La contribution des activités aberrantes de co-répresseurs à action DNMT et HDAC dans la perte de l'expression de ER $\alpha$  au sein des tumeurs mammaires ER $\alpha$ -négatives est connue depuis plus d'une dizaine d'années (Robertson *et al.*, 2000; Rountree *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2001). Ainsi, le traitement de cellules MDA-MB-231, lignée de cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -négatives, par TSA et 5-aza-2'-deoxycytidine (inhibiteur des DNMTs), induit l'expression de ER $\alpha$  dans ces cellules (Sharma *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2001). Conformément à ces résultats, le même traitement appliqué à une autre lignée de cellules tumorales ER $\alpha$ -négatives, MDA-MB-435, a pour effet de les sensibiliser aux thérapies hormonales (Fan *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2009). De fortes doses de HDACis seuls sont également capables de sensibiliser des cellules MDA-MB-231 au Tamoxifène<sup>®</sup>. Néanmoins, seule une très légère hausse de l'expression de ER $\alpha$  est observable dans ces conditions et l'effet sensibilisateur de TSA résiderait plutôt dans la stimulation de l'expression de ER $\beta$  et de son import vers le noyau (Fan *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2004; Kawai *et al.*, 2003).

Le traitement de cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives par des HDACis permet également de renverser la résistance acquise de ces cellules, les

rendant à nouveau sensibles aux œstrogènes (Fan *et al.*, 2008; Fiskus *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2004).

#### 4.6.3. EFFETS DES HDACIS SUR LA VOIE DE SIGNALISATION DES ŒSTROGÈNES DANS LES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES ER $\alpha$ -POSITIVES

Les HDACis répriment la transcription du récepteur ER $\alpha$  et des gènes cibles des œstrogènes. La baisse de l'expression de ER $\alpha$  par les HDACis est établie depuis de nombreuses années, puisqu'en 1992, De Fazio *et al.* le mettaient déjà en évidence en présence de SB (Ormandy *et al.*, 1992). Dans la lignée de cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives MCF-7, SAHA ou TSA diminue le taux d'ARNm et de protéine ER $\alpha$ . Les effets directs ou indirects des HDACis sur la répression de la transcription de ER $\alpha$  font encore débat. Certains mettent en évidence la perte des effets répresseur des HDACis en présence de cycloheximide (CHX) (inhibiteur de la synthèse protéique, permettant de n'observer que les phénomènes transcriptionnels primaires), (Reid *et al.*, 2005) alors que d'autres ne constatent pas d'effet de la CHX, concluant à un effet direct des HDACs dans le maintien de la transcription de ER $\alpha$  (Alao *et al.*, 2004). Finalement, des résultats publiés par notre laboratoire démontrent que la CHX induit une légère perte de la répression de la transcription de ER $\alpha$ , laissant penser qu'un phénomène direct est majoritairement responsable des phénomènes observés, et que des phénomènes indirects sont également impliqués dans le processus, en moindre mesure (Rocha *et al.*, 2005). La baisse de la transcription ERE-Luc par les fortes doses de HDACis, SAHA, TSA, VPA ou encore SB, de même que la répression de la transcription des gènes cibles des œstrogènes, comme ALPPL2 (alkaline phosphatase 2), pS2 ou CCND1 (cycline D1), est également clairement établie (Jang *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008).

En plus d'influencer l'expression de ER $\alpha$ , les HDACi influencent également directement la protéine ER $\alpha$ . Ainsi, SAHA, TSA ou VPA stimule la dégradation de ER $\alpha$  par le protéasome dans différentes lignées cellulaires tumorales mammaires et ovariennes (Fiskus *et al.*, 2007; Margueron *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008). Plus récemment, l'implication du niveau d'acétylation de Hsp90, cible de HDAC6, a été pointé du doigt comme mécanisme important lié à la dégradation de ER $\alpha$  à la suite d'une exposition aux HDACis. Hsp90 lie ER $\alpha$  dans le complexe inhibiteur en absence de ligand. L'hyper-acétylation de cette dernière, en présence de SAHA ou simplement par l'inhibition spécifique de HDAC6, inhibe ses propriétés de chaperonne, libérant ainsi ER $\alpha$  (Fiskus *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008). ER $\alpha$  est alors ubiquitinilé et dégradé par le protéasome.

Ainsi, les HDACis inhibent la voie de signalisation des œstrogènes par plusieurs mécanismes distincts : ils répriment l'expression du récepteur ER $\alpha$ , tout en induisant sa dégradation par le protéasome et inhibent également la transcription des gènes cibles des œstrogènes. Par conséquent, les HDACis inhibent la prolifération des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives. Par exemple, la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 est réprimée par SAHA, qui provoque également un faible taux d'apoptose (Munster *et al.*, 2001).





## **OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES**



De par leur impact sur les processus impliqués dans la tumorigenèse, les inhibiteurs des histones désacétylases constituent une cible attrayante pour le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales. En effet, leurs effets ciblent particulièrement les cellules tumorales, puisque ces dernières y sont plus sensibles que les cellules normales. Même s'ils ne sont, pour le moment, que peu efficaces dans le traitement des tumeurs solides, ils démontrent des propriétés fort intéressantes lorsqu'ils sont combinés avec d'autres agents anti-néoplastiques.

L'association des HDACis avec des anti-œstrogènes partiels est largement documentée dans les cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -négatives ou ER $\alpha$ -positives résistantes aux anti-œstrogènes : dans les deux cas, les HDACis sensibilisent les cellules au Tamoxifène<sup>©</sup>, permettant ainsi la potentialisation de ses effets. Par contre, les effets des HDACis combinés à des anti-œstrogènes dans les cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives ne sont pas clairement établis. Encore moins lorsqu'il s'agit d'anti-œstrogènes totaux.

Ces derniers ont pour effet d'inhiber la voie de signalisation des œstrogènes et ses conséquences sur la prolifération des cellules ER $\alpha$ -positives, en ciblant le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ , principalement via sa dégradation et ce, de manière HDAC-indépendante. Dans le cadre de l'**article trois**, notre étude s'appuie sur l'hypothèse selon laquelle, l'ajout de HDACi au traitement ICI permettrait également d'induire la dégradation du récepteur et l'inhibition de son expression, mais aussi d'agir sur les autres facteurs de la voie de signalisation tripartite des œstrogènes (figure 26). Alors, les HDACis pourraient agir de concert avec ICI pour diminuer plus efficacement ou plus rapidement la voie des œstrogènes en modulant l'activité des effecteurs de cette voie ou encore en agissant sur la transcription des gènes cibles des œstrogènes. Ainsi, nous tenterons de démontrer que ce co-traitement a pour effet une inhibition accrue de la prolifération des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives.

La combinaison de ICI et SAHA a pour but final d'augmenter l'efficacité des traitements tout en réduisant leur caractère toxique pour les cellules normales, afin de prolonger la survie des patients tout en augmentant leur qualité de vie. Son étude, dans l'article trois, a également pour objectif une meilleure compréhension de l'impact des HDACis sur les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives et sur la voie des œstrogènes en elle-même.

L'activité du récepteur des œstrogènes repose sur les trois facteurs du modèle tripartite de l'activité des récepteurs stéroïdiens : le récepteur lui-même, les ligands et les effecteurs (figure 26). En temps que récepteur nucléaire, l'activité du récepteur des œstrogènes dépend de sa liaison spécifique à l'ADN. Depuis plus d'une trentaine d'années, de nombreux efforts ont été réalisés afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la spécificité de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN. Ayant pour objectif d'approfondir les connaissances dans ce domaine, la spécificité de liaison de ER $\alpha$  à l'ADN a été testée dans le cadre des interactions simples mettant en jeu un acide aminé et une base (K206/G-5 et R211/G+2) dans l'**article deux**, mais aussi dans celui, plus compliqué, de la liaison de deux résidus aux deux mêmes paires de bases sur les brins complémentaires de l'ADN de l'ERE consensus (E203 et K210 lient GC-4-3) dans l'**article un**. L'importance de chacun des déterminants de l'interaction entre ER $\alpha$  et l'ERE pourra aussi permettre une meilleure compréhension du choix des sites de liaison. A terme, cette étude a pour finalité d'aboutir à une éventuelle utilisation des récepteurs nucléaires stéroïdiens comme outils de thérapie génique, tels que les récepteurs C2H2. Ils auraient comme avantage supplémentaire d'être capable de lier des séquences d'intérêt de manière inductible.





**ARTICLE 1**





## Rational design of an estrogen receptor mutant with altered DNA-binding specificity

*Denis Nguyen, Martine Bail, Genevieve Pesant, Virginie N. Dupont, Etienne Rouault, Julie Deschênes, Walter Rocha, Geneviève Melançon, Sergey V. Steinberg and Sylvie Mader*

### CONTRIBUTION DES AUTEURS :

---

- *Denis Nguyen et Martine Bail* ont conçu, exécuté et analysé l'ensemble des expériences et figures, à l'exception des figures de modélisation moléculaire.
- *Geneviève Pesant* a accompli la modélisation moléculaire des figures 3 et 9.
- *Virginie N. Dupont* (avec *Martine Bail*) a réalisé les essais de transactivation CAT et westerns associés donnant lieu à la figure 8, à une figure supplémentaire pour les relecteurs et confirmant les résultats de la figure 5. Elle a aussi participé à la relecture du manuscrit et la mise en forme globale des figures.
- *Etienne Rouault, Julie Deschênes, Walter Rocha et Geneviève Melançon* ont participé à la réalisation des résultats préliminaires
- *Sergey V. Steinberg* a supervisé le travail de *Geneviève Pesant*.
- Cette étude a été réalisé sous la direction de *Sylvie Mader*.



# Rational design of an estrogen receptor mutant with altered DNA-binding specificity

Denis Nguyen<sup>1</sup>, Martine Bail<sup>1,2</sup>, Genevieve Pesant<sup>1</sup>, Virginie N. Dupont<sup>1,2</sup>, Étienne Rouault<sup>1</sup>, Julie Deschênes<sup>1,2</sup>, Walter Rocha<sup>1,2</sup>, Geneviève Melançon<sup>1</sup>, Sergey V. Steinberg<sup>1</sup> and Sylvie Mader<sup>1,2,\*</sup>

Received November 1, 2006; Revised March 24, 2007; Accepted April 2, 2007

## ABSTRACT

Although artificial C2-H2 zinc fingers can be designed to recognize specific DNA sequences, it remains unclear to which extent nuclear receptor C4 zinc fingers can be tailored to bind novel DNA elements. Steroid receptors bind as dimers to palindromic response elements differing in the two central base pairs of repeated motifs. Predictions based on one amino acid–one base-pair relationships may not apply to estrogen receptors (ERs), which recognize the two central base pairs of estrogen response elements (EREs) via two charged amino acids, each contacting two bases on opposite DNA strands. Mutagenesis of these residues, E203 and K210 in ER $\alpha$ , indicated that both contribute to ERE binding. Removal of the electric charge and steric constraints associated with K210 was required for full loss of parental DNA-binding specificity and recognition of novel sequences by E203 mutants. Although some of the new binding profiles did not match predictions, the double mutation E203R-K210A generated as predicted a mutant ER that was transcriptionally active on palindromes of PuGCTCA motifs, but not on consensus EREs. This study demonstrates the feasibility of designing C4 zinc finger mutants with novel DNA-binding specificity, but also uncovers limitations of this approach.

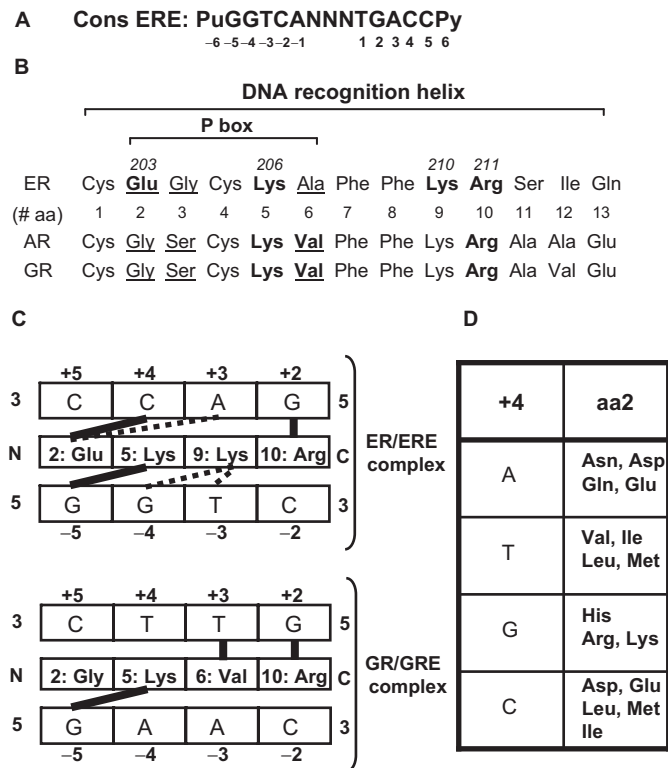
## INTRODUCTION

Nuclear receptors form a superfamily of ligand-inducible transcription factors that is characterized by two conserved domains, the DNA-binding domain (DBD) composed of two C4 type zinc fingers, and the ligand-binding domain (LBD), which also contains a dimerization

interface (1,2). Nuclear receptors can bind DNA as homo- and/or heterodimers, and recognize response elements arranged as direct repeats, palindromes or inverted palindromes of conserved motifs (3–5). Each motif is bound by the DBD of a single monomer, the two zinc fingers of the DBD combining into a single structural fold with a DNA recognition helix and variable dimerization interfaces (6,7).

Consensus estrogen response elements (EREs, Figure 1A), which are palindromes of PuGGTCA motifs with a three base-pair spacer (8–10), are bound by estrogen receptors (ERs) with highest affinity *in vitro*. Perfect or imperfect EREs present at promoter-proximal locations (11–13) or, as revealed by genome-wide screens, at large distances from the transcriptional start site of estrogen-regulated genes (14,15), are bound by ER $\alpha$  *in vivo* and mediate regulation of estrogen target genes. Other steroid receptors, including the androgen receptor (AR) and glucocorticoid receptor (GR), also bind palindromes with a three base-pair spacer, but the repeated motifs are PuGNACA sequences (16,17). Non-steroid receptors also recognize PuGGTCA or related motifs, but these motifs are arranged as direct repeats or everted repeats with variable spacing. The affinity and selectivity of nuclear receptors for single PuGGTCA motifs is generally low, but can be increased by receptor-specific recognition of additional 5' flanking bases (5,13). Thus, nuclear receptors have achieved selectivity in DNA recognition while interacting with only two main types of motifs. The fact that few variations have been observed in the base-contacting amino acids of the 48 human nuclear receptors (18) suggests that this type of protein–DNA recognition has been conserved throughout evolution, possibly because it affords the most favorable combination of affinity and selectivity. Interestingly, however, nuclear receptor homologs identified in *Caenorhabditis elegans* offer a considerably wider variety of amino acid composition in the DNA recognition helix. Numerous mutations have also been described in the DBD of some nuclear receptors such as

\*To whom correspondence should be addressed.



**Figure 1.** Model for the selectivity of steroid receptor DNA interactions. (A) Sequence of the consensus ERE and base numbering used in this study. (B) DNA recognition helix of the estrogen (ER), glucocorticoid (GR) and androgen (AR) receptors. The position of amino acids in the DNA recognition helix is indicated by numbers from 1 to 13. The numbering of base interacting residues in ER $\alpha$  is also indicated. Base interacting residues in each receptor are in bold, and P box amino acids are underlined. (C) Models of the amino acid base interactions underlying specific recognition of the estrogen (top) or glucocorticoid (bottom) response element by their cognate steroid receptors. Interactions considered in the model proposed by Suzuki and Yagi (29) are in bold, while interactions described in the ER/ERE crystal structure (7) but not in the model are in dashed lines. (D) Predicted interactions between amino acid replacement at position 2 of the DNA recognition helix and bases at position +4 [from (29)].

VDR and AR, but few changes in DNA-binding patterns have been reported for these mutant receptors (19).

The first clues to the molecular basis of specific DNA recognition by steroid receptors were provided by mutagenesis experiments of the ER and GR, which led to the identification of amino acids responsible for discrimination between the two types of recognition motifs bound by these receptors. Exchanging three amino acids in the ER DBD for the corresponding ones in the GR DBD resulted in a receptor mutant capable of transactivating glucocorticoid target promoters (20). The converse experiment also demonstrated that amino acids at the same three positions (P box, Figure 1B, underlined residues) in the GR were crucial for discriminating between glucocorticoid response elements (GREs) and EREs (21,22). In addition, a loop in the second zinc finger was found to be responsible for specific recognition of two motifs arranged as palindromes with 3 bp spacing (21–23). Crystallographic analyses of complexes between the ER or

GR DBDs and their response elements have uncovered the amino acid–base-pair interactions established by these two receptors (7,24). Two residues of the P box, V at the third position in the GR and E at the first position in the ER (E203), contact the central discriminating bases in the ERE and GRE motifs (Figure 1C). In addition, an invariant K residue located further C-terminal in the DNA recognition helix (K210 in ER $\alpha$ ) binds the two central bases on the opposite strand with respect to bases contacted by E203 in the ER $\alpha$ –ERE complex, but does not participate in contacts in the GR–GRE complex (Figure 1C). Other bases common to the ERE and GRE are contacted by amino acids conserved in ER and GR (K206 and R211 in ER $\alpha$ ). In addition, these interactions are buttressed by a complex network of amino acid–amino acid interactions and amino acid–phosphate interactions.

The specificity of response motif recognition by steroid receptors is thus determined by a small number of specific interactions established by 3–4 amino acids. As a consequence, it may be expected that changing the identity of interacting amino acids in the DNA recognition helix would alter the selectivity of receptor–DNA interaction as can be achieved with artificial C2H2 zinc fingers (25–28). A simple model for amino acid–base interactions within the structural framework of the steroid receptor DBD has been proposed (29). This model relies on chemical rules for possible pairing of amino acid side chains and DNA bases through hydrogen bonding or hydrophobic interactions, and also incorporates stereochemical constraints specific to steroid receptors, based on the position of the DNA recognition helix with respect to the major groove of the DNA. Small, medium or large chains may thus be preferred depending on the position of the interacting amino acids in the DNA recognition helix with respect to the bases (see Figure 1D for possible interactions involving amino acid at position 2). Study of a spontaneous mutation in the first amino acid of the P box of the AR has revealed changes in DNA-binding specificity compatible with the predictions of this model (19). Replacement of G at the first P box position in the AR DBD by R resulted in a mutant that could only bind a subset of the PuGNACA motifs normally bound by this receptor, and this according to the chemical preferences of the R residue with respect to the base at the third position of the motif. However, it remains unclear whether novel types of DNA specificities can be achieved through rational design of nuclear receptor mutants, especially in the case of the ERs, which appear to have more complex determinants of motif recognition than other steroid receptors. The purpose of this study was to examine whether mutating ER $\alpha$  residues that interact with the two central base pairs of EREs either separately or in pairs could generate artificial nuclear receptor DBDs with novel DNA-binding specificities.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids

The bacterial expression vector pET3.1-HE81 containing the ER $\alpha$  DBD has been described previously (23).

The bacterial expression vector pET3.1-ER $\beta$ -DBD was constructed by PCR amplification of a cDNA fragment corresponding to amino acids 140–246 of ER $\beta$  and subcloning between the KpnI and XhoI sites of a pET3.1, a pET3 (Novagen, San Diego, CA, USA) derivative modified by insertion of a linker containing the KpnI and XhoI sites (23). All ER $\alpha$  DBDs mutants were constructed by insertion between the KpnI and XhoI sites of the pET3.1 vector of a fragment obtained by site-directed mutagenesis of pET3.1-HE81 using PCR amplification.

The wild-type ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression vectors pSG5-HEG0, pCMV-SPORT-ER $\beta$  have been described previously (15,30). Expression vectors for ER $\alpha$ E203A, ER $\alpha$ E203N, ER $\alpha$ E203H, ER $\alpha$ E203R, ER $\alpha$ K210A, ER $\alpha$ E203A-K210A, ER $\alpha$ E203N-K210A, ER $\alpha$ E203H-K210A, ER $\alpha$ E203R-K210A have been constructed by substitution of the fragment between the KpnI and XhoI sites of pSG1-HE80 (23) by a fragment containing the mutation excised from the corresponding pET3.1 vector.

The tk-CAT reporter plasmids containing one copy of the consensus ERE or of palindromes containing base replacements (pAT-tkCAT, pCT-tkCAT) were derived from the pBL-CAT8+ reporter vector (8) by insertion of double stranded oligonucleotides containing the response elements flanked with BamHI-BglII sites at the BamHI site upstream of the thymidine kinase promoter. The TATA-CAT reporter vectors containing two copies of the consensus ERE or of the CT palindrome were prepared by substitution of the three EREs in pERE3-TATA-CAT (31) by double-stranded oligonucleotides containing two tandem response elements and flanked by BamHI and BglII sites.

#### Expression in *Escherichia coli* of ER $\alpha$ and ER $\beta$ DBDs and derivatives thereof

*Escherichia coli* BL21 DE3 cells were transformed with pET3.1 expression vectors containing the cDNAs for the DBDs of ER $\alpha$ , or of mutants of ER $\alpha$  or ER $\beta$  and expression was induced in exponentially growing cultures by IPTG (0.5 mM final) for 2 h. Whole bacterial extracts were prepared by sonication in extraction buffer (Tris-HCl pH 7.4, 25 mM; EDTA pH 8.0, 0.1 mM; NaCl 400 mM; glycerol 10%; DTT 1 mM; PMSF 10 mM and protease inhibitors) followed by centrifugation (at 10000g for 15 min) of lysates.

To determine the levels of expression of ER DBDs, aliquots (1 ml) were taken from each culture before induction with IPTG. Bacteria were isolated by centrifugation and resuspended in M9 medium containing each amino acid except methionine and cysteine (0.01% weight/volume each). Rifampicin was added (200  $\mu$ g/ml final) to inhibit bacterial RNA polymerase and expression of the T7 polymerase was induced with IPTG (0.5 mM final) for 30 min. [<sup>35</sup>S]-methionine was then added and bacteria were further incubated at 37°C for 5 min, collected by centrifugation, resuspended in Laemmli buffer and boiled for 5 min. Labeled proteins were analyzed by electrophoresis on 12% polyacrylamide-SDS gel and visualized by fluorography.

#### Cell culture and transfection

HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS). Cells were switched 3 days before transient transfection to medium without phenol red containing 5% FBS pretreated with activated charcoal to remove traces of hormones. For gel shift assays, cells were transiently transfected with ER expression vectors (5  $\mu$ g completed to 15  $\mu$ g with carrier DNA in 10 cm dish) using the calcium phosphate method (32). For CAT assays, HeLa cells were electroporated (10<sup>7</sup> cells, 0.24 kV, 950  $\mu$ F in a Bio-Rad Gene Pulser II apparatus) with varying amounts of expression vectors for wt ER $\alpha$  or for different ER $\alpha$  mutants, 4  $\mu$ g of pCMV- $\beta$ Gal, and 4  $\mu$ g of tk-CAT reporter vectors containing single copies of different palindromic response elements. DNA mixes were completed to 80  $\mu$ g with salmon sperm DNA in a final volume of 100  $\mu$ l of NaCl 210 mM. Electroporated cells were plated in duplicate for parallel immunoblot and CAT assays.

#### Gel shift assays

Two days post-transfection, HeLa cells were treated for 1 h with 25 nM estradiol and whole cell extracts were prepared by three cycles of freeze-thawing in extraction buffer (Tris HCl pH 7.6, 20 mM; glycerol 20%; KCl 500 mM; DTT 1 mM; EDTA 0.1 mM; PMSF 10 mM and protease inhibitors) followed by centrifugation for 10 min at 13000g. Cell extracts were diluted to a final KCl concentration of 125 mM. Samples were preincubated with 2  $\mu$ g poly(dIdC) for 15 min on ice before addition of [<sup>32</sup>P]-labeled double-stranded oligonucleotide probes (300 000 c.p.m. per sample). The consensus ERE used for gel retardation assays is derived from the *Xenopus* vitellogenin A2 gene. Reactions were incubated at 25°C for 15 min then loading buffer (0.1% bromophenol blue, 60% glycerol) was added (1/5 V/V). Complexes were separated by electrophoresis on 5% polyacrylamide gels in 0.25 $\times$  TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA) and visualized by autoradiography. Amounts of bound and free probe were quantified using a Phosphorimaging screen and the Quantity One software from Bio-Rad.

Gels shift assays with whole bacterial extracts containing the ER $\alpha$  or ER $\beta$ DBD were performed as described above except that extracts were diluted to a final NaCl concentration of 80 mM and 7% polyacrylamide gels in 0.25 $\times$  TBE were used to separate the complexes.

#### CAT assays

Immediately after seeding, cells were treated with estradiol (25 nM) or vehicle (EtOH) for 40 h. Cells were then harvested and extracts were prepared by three cycles of freeze-thawing in CAT extraction buffer (Tris HCl pH8.0, 0.25 M; DTT 1 mM and protease inhibitors). CAT assays were performed and standardized over  $\beta$ -galactosidase activity as described (31).

## Immunoblot analyses

Protein concentrations in whole cell extracts prepared for gel shift or CAT assays were estimated using a Bradford assay. Proteins (50  $\mu$ g) in Laemmli buffer were separated by electrophoresis on 8% polyacrylamide–SDS gels and transferred onto a PVDF membrane. Blots were incubated in blocking solution (PBS 1X, Tween 20 0.05%, BSA 3%) for 1 h and probed with anti-ER $\alpha$  mouse monoclonal antibody B10 (obtained from Prof. P. Chambon) at dilution 1:5000. Membranes were then washed and incubated with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and visualized with an ECL detection kit.

## Modeling

Modeling was performed interactively, using the InsightII/Discover package (Version 2000, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). The X-ray structure of the ER DBD bound to DNA (7) was used as a starting conformation. Each model was submitted to unrestrained energy minimization using the AMBER forcefield (33) until an energy minimum was reached. The presence or absence of particular pair-wise amino acid–base interactions in the final structure was treated as a possibility or impossibility to form a particular interaction in a given structural context. Distance measurements between atoms were performed with InsightII tools using a Silicon Graphics O2 computer.

## RESULTS

### Patterns of response element binding by isolated ER $\alpha$ and ER $\beta$ DBDs are similar to each other and to those of the full-length receptors

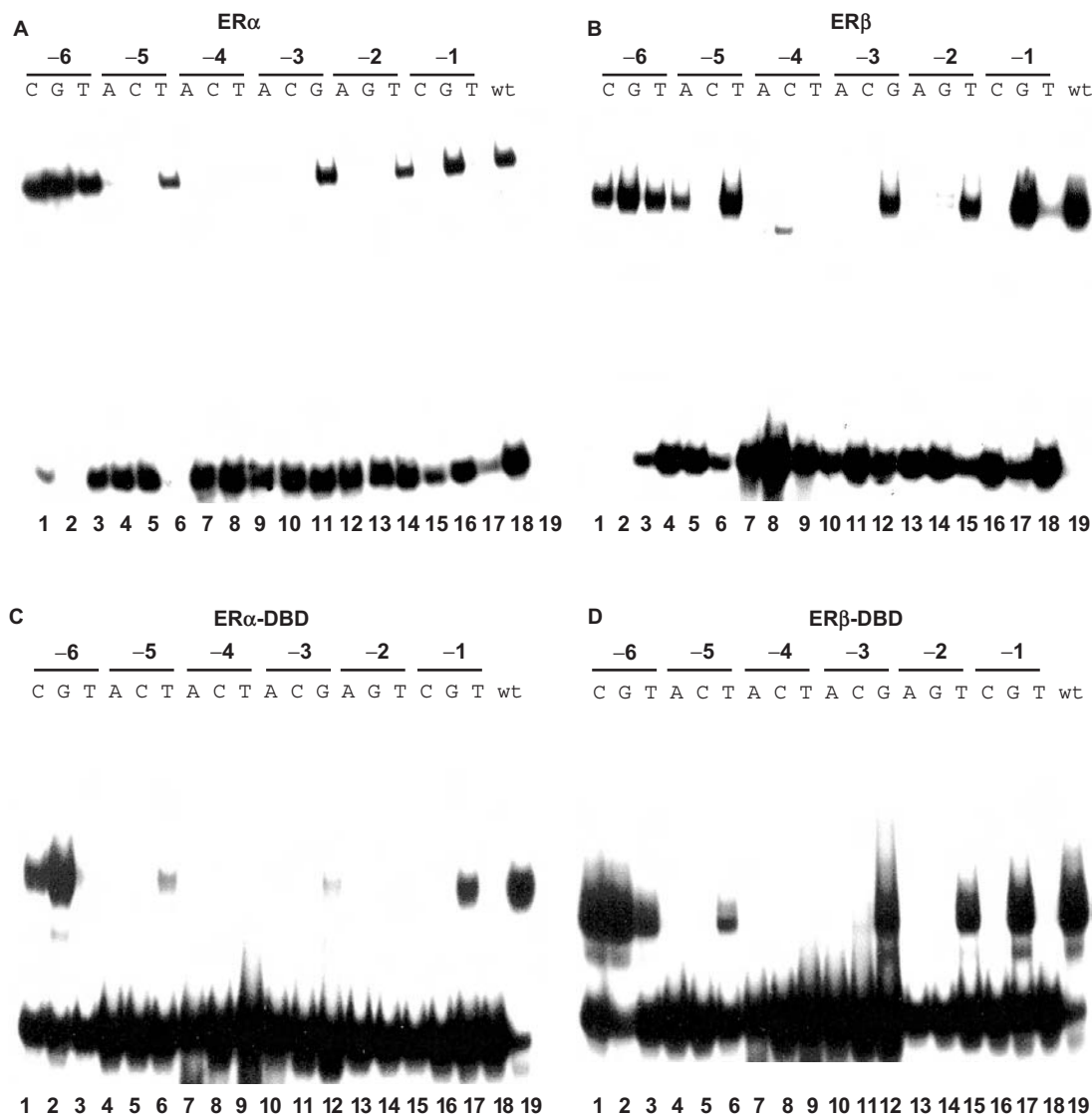
Estrogen receptors bind with high affinity the consensus palindromic EREs consisting of two PuGGTCA motifs separated by a three base-pair spacer (Figure 1A). Although natural response elements are often imperfect palindromes (12,13), base-pair replacements usually result in a loss of affinity (12,14). To verify that binding patterns are mainly derived from the DBDs of ERs, we have compared the effect of symmetric substitutions at each position of the consensus ERE on binding by full-length ERs transiently expressed in HeLa cells (ER $\alpha$  and ER $\beta$ , Figure 2A and B, respectively) or by the ER $\alpha$  or ER $\beta$  DBD (ER $\alpha$  DBD and ER $\beta$ DBD, Figure 2C and D, respectively). The wild-type ERE was bound by either the full-length ER $\alpha$  receptor or the corresponding DBD with the highest affinity (note the higher degree of free probe depletion with wt ERE, Figure 2A and C, lanes 19). Consistent with our previous observations that the DBDs of steroid receptors are sufficient to discriminate between EREs and GREs (23), ER DBDs selectively bound the array of probes in a pattern similar to that of the full-length receptors, although all probes were less efficiently bound with isolated DBDs. This is consistent with a loss of affinity, but not specificity, resulting from the absence of the strong dimerization interface in the LBD (34). In addition, all replacements introduced in both arms of the ERE reduced binding to the same extent for ER $\alpha$  and

ER $\beta$  (compare panels A and B, and C and D), which share a high degree of conservation in their DBDs [90% in region C as defined in (35)]. Although the expression levels of transiently expressed full-length ER $\alpha$  and ER $\beta$  could not be compared, note that the DBDs were expressed to similar levels as assessed by [<sup>35</sup>S]Met incorporation (data not shown).

### Point mutations in the consensus ERE destabilize interaction with ERs according to chemical compatibility and steric constraints with interacting amino acids

The DNA recognition helix formed by the C-terminal part of the first zinc finger of ER $\alpha$  contains several basic amino acids involved in contacts with bases in the target motifs (Figure 1B, residues in bold; underlined residues are part of the P box). Nucleotides G (–5) and G (+2) interact with residues at position 5 (K206) and 10 (R211) of the DNA recognition helix, respectively (Figure 1C). In addition, K210 (position 9 in the DNA recognition helix) interacts with both G (–4) and T (–3) through direct and water-mediated contacts (Figure 1C). Thus, basic residues are involved in recognition of all positions in the ERE except –/+6 and –/+1, which are not directly contacted in the crystal structure, although both display a preference for purines (Figure 2 A–D, lanes 1–3 and 16–18). These direct interactions involving basic amino acids conform to general chemical rules, with G and T, which present only negatively charged groups in the major groove, being preferred over A, which presents both a positively and a negatively charged group, and C, which contains only a positively charged group, leading to unfavorable electrostatic interactions. Accordingly, replacement of G by C in a single motif at position –4 or –5 was sufficient to abolish binding (Figure 3A, lanes 5 and 8). Of note however, the order of the preferred bases is not identical for each contacting basic amino acid. Most noticeably, replacement in a single motif of G at position +2 by T was sufficient to abolish binding (Figure 3A, lanes 13). Molecular modeling suggests that lack of binding to T at position +2 results from steric hindrance due to the methyl group of T+2, which prevents productive interaction between the amines of R211 and O4 of T+2 (Figure 3B).

The pattern of recognition of bound response elements carrying replacements at positions –4 (G>A>T>C) and –3 (T>G>A>C) also differed from that predicted from charge preference due to interaction with basic amino acid K210 (G>T>A>C). Because E203 interacts with bases at positions +3 and +4, i.e. on the other DNA strand, in the crystal structure (7), we compared the roles of both K210 and E203 in modulating patterns of base recognition. While E203 has an opposite and complementary type of chemical selectivity for bases (C>A>T>G) compared to K210, the complex mode of recognition of the two central base pairs by two amino acids may be expected to result in increased steric constraints. At position –4, replacement in a single motif by T drastically reduced binding (Figure 3A, lane 9) and replacement in both motifs of the ERE completely eliminated complex formation (Figure 2A–D, lanes 9) and transactivation [data not



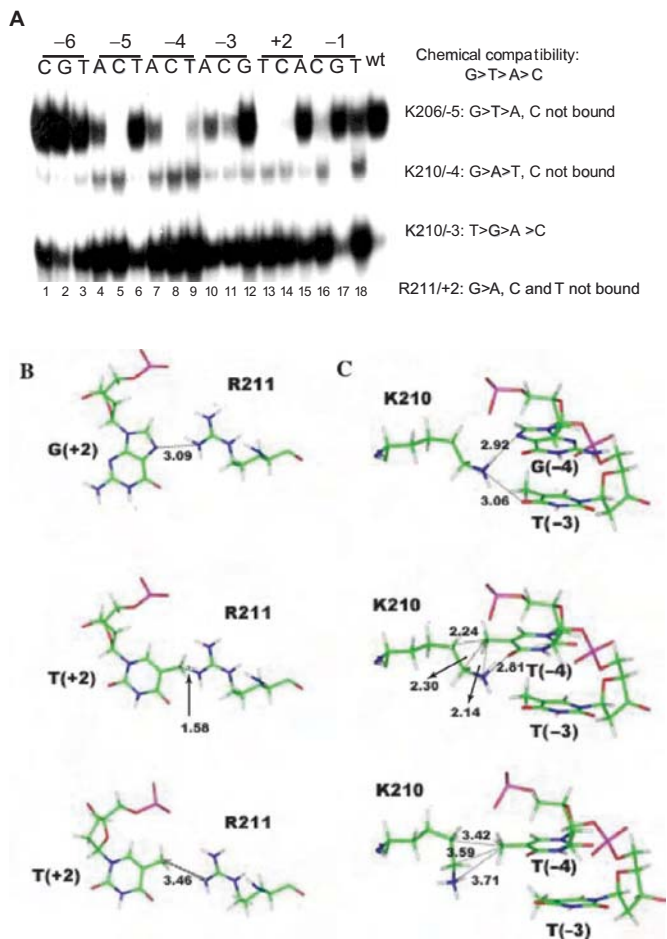
**Figure 2.** Effect of replacements in both arms of the ERE palindrome on complex formation with full length ERs and isolated DBDs. (A and B) Gel shift assays performed with whole cell extracts of HeLa cells transiently transfected with expression vectors for  $ER\alpha$  (B) or  $ER\beta$  (C), and a panel of probes corresponding to all base possibilities introduced at each position of the response elements in both arms of the palindrome. (C and D) Gel shift assays performed with bacterial extracts containing the DBDs of  $ER\alpha$  (C) or  $ER\beta$  (D), using the same panel of probes as in A and B.

shown, see also (36)]. This contrasts with the capacity of other nuclear receptors such as RAR, RXR and VDR to bind to PuGTTCA motifs [(36,37); see also (5) for a review]. Energy minimization indicates that movement of K210 to avoid the methyl group of T-4 prevents interaction with DNA (Figure 3C). In addition, E203 is not capable of interacting with the amino group of A at position +4 (not shown). At position -3, G was less favorable than T (compare lanes 12 and 19 in Figure 3A and Figure 2A–D), contrary to what is observed at the other positions recognized by basic residues (Figure 3A). Modeling indicates that C+3 would create packing problems with E203, preventing interaction of this amino acid with C + 4, and K210 is too distant to interact with G-3 (not shown). Thus, our experimental and

modeling data suggest that both E203 and K210 contribute to the selectivity of response element recognition with respect to the two central bases of the ERE.

#### **Roles of E203 and K210 in the specificity and affinity of ER interaction with palindromic response elements**

To better analyze the respective roles of E203 and K210 in determining the specificity and affinity of ER interaction with response elements, we further characterized the ER-binding specificity with respect to the two central base pairs of the palindrome motifs using a panel of 16 probes representing all combinations of these central bases introduced in both arms of the palindrome. Full-length ERs and isolated DBDs bound with high affinity only to



**Figure 3.** Chemical and steric constraints determine the specificity of complex formation with wt ER $\alpha$ . **(A)** Gel shift assays performed with the isolated ER $\alpha$  DBD and a panel of probes containing all possible base replacements introduced at each position of a single motif of the consensus ERE. Predicted and observed patterns of interactions are described on the right hand side of the figure. **(B)** Interaction between R211 and G +2 as seen in the crystal structure of the ERDBD/ERE (7) (top panel). Note the H bond formed between the amino group of R211 and the N7 atom of G +2. Replacement of G +2 (top panel) by T +2 (middle panel) results in steric conflict between the amino groups of R211 and the methyl group of T +2; energy minimization shows that steric hindrance can be relieved, but R211 cannot interact in the major groove with O4 of T +2. **(C)** Interaction between K210 and G 4 and T 3 as seen in the crystal structure of the ERDBD/ERE complex (24) (top panel); note the H bonds formed between the amino group of K210 and the N7 atom of G 4 and the O4 atom of T 3; replacement of G 4 (top panel) by T 4 (middle panel) results in steric conflicts between the side chain of K210 and the methyl group of T 4; energy minimization shows that displacement of the K210 side chain to accommodate this methyl group prevents K210 from interacting with charged groups of T 4 and T 3.

the GT (response elements are designated by bases found on the minus strand at position -4/-3) combination found in the wt ERE and, with lower affinity, to the GG element (Figure 4A–D). Note that complexes formed on element CC with full-length receptors (lane 6) were also observed with extracts from cells transfected with the parental expression vector, and that the smears observed in some lanes with bacterially expressed ER DBDs also appeared with extracts from bacteria transformed with the parental expression vector (not shown).

The very high selectivity of ERs for the two central base pairs in their response elements differs from that of the GR or AR, whose DBDs could both recognize all four PuGNACA-containing palindromes [(20) and data not shown]. Crystallographic analysis of the GR DBD indicates that contacts are established only with the base at position +3 through a V residue (position 6 in the DNA-binding helix). E203 is replaced by a G residue in GR and AR, and the K residue corresponding to K210 in ER $\alpha$  does not contribute to GRE recognition. The higher selectivity of ER interaction with response elements could therefore result either from the fact that E203 interacts with both adjacent +4/+3 bases, and/or from the contribution of K210 in recognizing the -4/-3 bases on the opposite strand of DNA.

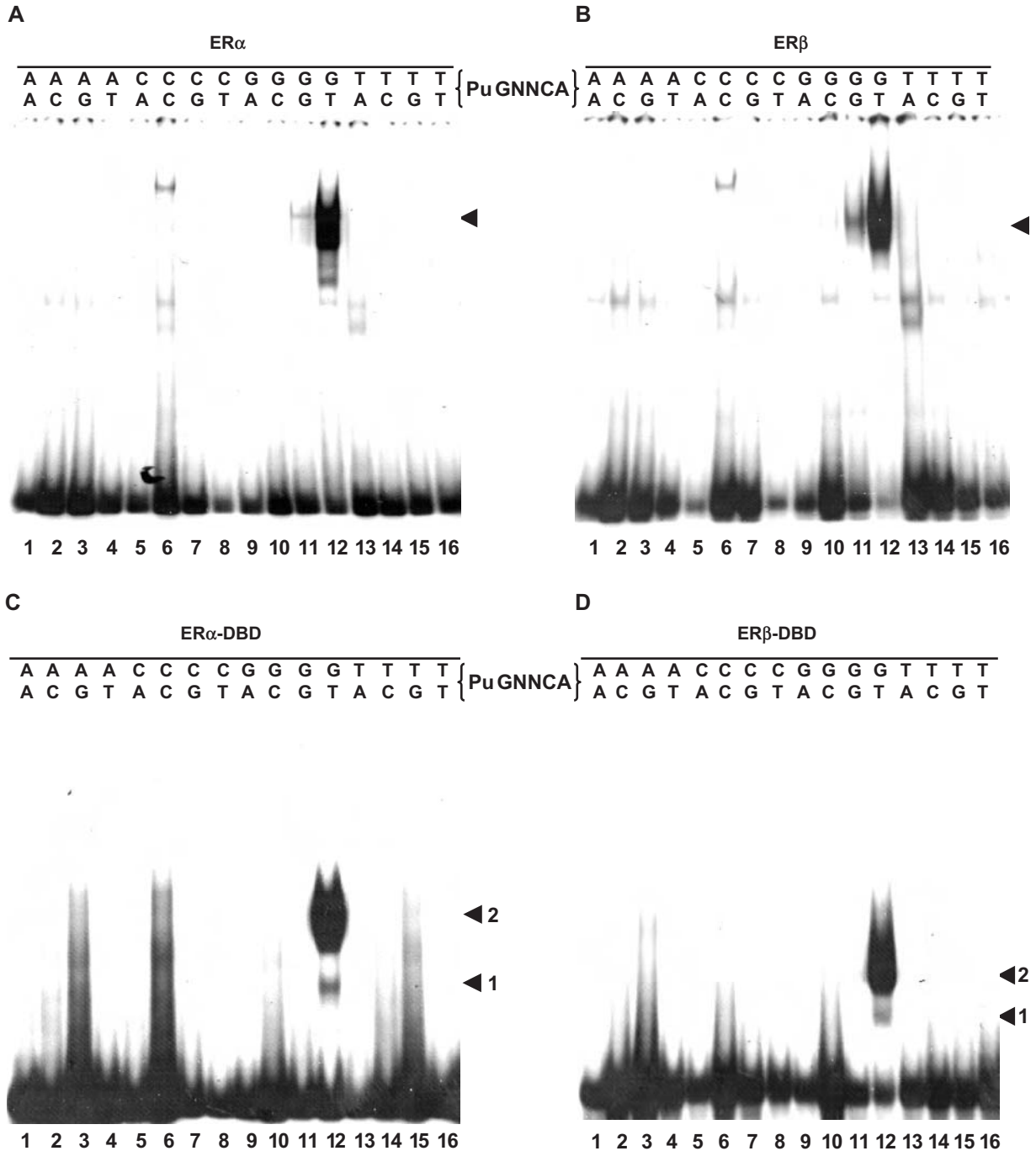
To investigate the respective roles of these two amino acids to the affinity and/or selectivity of binding, we replaced either E203 or K210 by A residues in ER $\alpha$  and examined complex formation with the panel of 16 probes corresponding to all possible variants at the two central positions of the repeated motifs. Both mutants still bound with highest efficiency to the consensus ERE (Figure 5A, lanes 12), although the intensity of the retarded band was ~5- to 10-fold lower than with the wt ER $\alpha$  (compare Figure 5A, lanes 12 and 17; see also Figure 5B). However, the K210A mutation was active in transactivation assays using a reporter gene containing the consensus ERE (Figure 8C). Intriguingly, peak transcriptional activity was ~60% higher for K210A than for the wt receptor, suggesting that K210 plays a negative role in transcriptional activation.

Mutant E203A bound with reduced efficacy to the consensus ERE compared to the wt ER $\alpha$  (Figure 5A and B), and formed a weak complex with the PuGATCA probe (AT, Figure 5A, lane 4), which was not detected with the K210A mutation. Finally, the double mutant K210A–E203A bound very weakly to the consensus ERE probe, and also formed a detectable complex with the AT probe (Figure 5A, lanes 4, 8, 12 and 16). Binding of E203A to the AT probe suggests that the main role in restricting binding to this element in the wt receptor is played by E203 rather than K210. The absence of high affinity complexes observed with the K210A mutant suggests that the role of K210 in the selectivity of response element recognition is redundant with the role played by E203.

### The effects of mutations of E203 on selective DNA binding are not predictable from simple chemical and steric compatibility rules

A simple DNA recognition model for steroid receptors has been proposed previously (8), based on both the general rules of chemical compatibility between amino acids and base pairs, and stereochemical constraints due to the position of the DNA-binding helix across the major groove as derived from the crystal structures of the ER and GR DBDs (Figure 1D for predicted interactions at amino acid position 2). Note that this model is based on a one amino acid–one base interaction relationship, and in particular does not take into account recognition of the

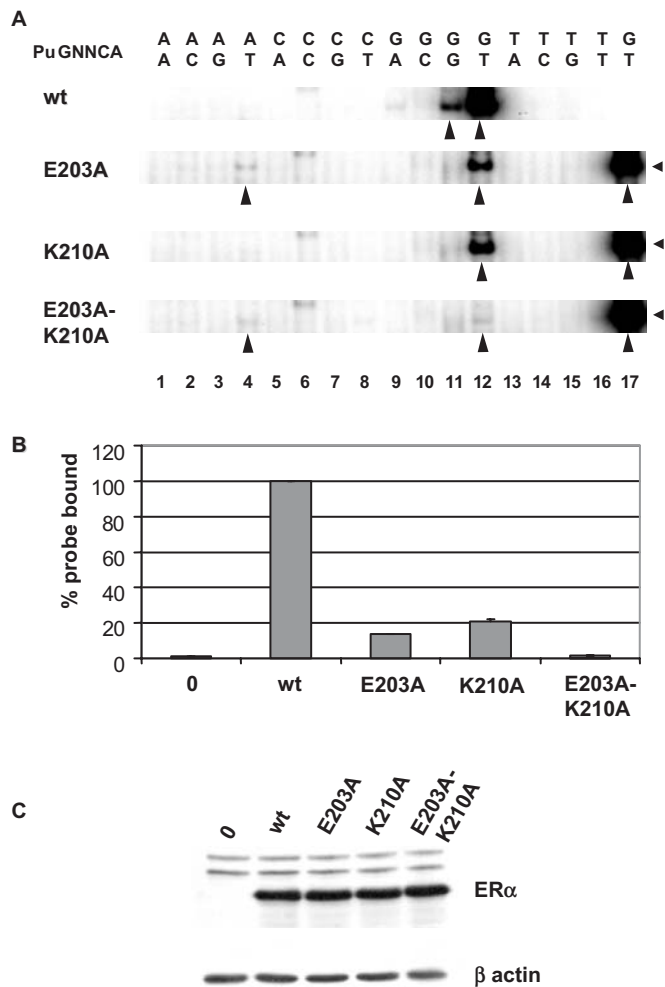




**Figure 4.** ERs bind with high selectivity to PuGNNCA palindromes. (A) and (B) Extracts from transiently transfected HeLa cells expressing full length ER $\alpha$  (A) or ER $\beta$  (B) were incubated with <sup>32</sup>P labeled oligonucleotide probes containing PuGNNCA palindromes and complexes were separated on 5% polyacrylamide gels. The position of the dimeric complex is indicated by an arrow. (C) and (D) Bacterial extracts containing the ER $\alpha$  (C) or ER $\beta$  (D) DBDs were incubated with the same probes and complexes were separated by electrophoresis on 7% polyacrylamide gels. The position of specific complexes containing monomers (1) or dimers (2) of ER DBDs are indicated in the figure.

two central bases by both K210 and E203 (Figure 1C, dotted lines), considering only the role of E203 with C+4 (Figure 1C, bold line). Our finding that E203 and K210 cooperate for selective binding to GT palindromes incited us to test the predictions of this model for replacement of E203 by other amino acids. Replacement of E by N is predicted to switch recognition from C at position +4 to A

(TN elements), and replacement by H or R should lead to specific recognition of a G at this position (CN elements, Figure 1D). These mutations were introduced in ER $\alpha$  full length and in the isolated DBD. Similar expression levels were obtained for all full-length mutants and the wild-type receptor as determined by western analysis (data not shown). Whole cell extracts containing the mutant



**Figure 5.** Role of K210 and E203 in the affinity and specificity of receptor DNA complex formation. (A) Gel shift assays performed with wt ER $\alpha$  or the K210A, E203A and E203A K210A mutants expressed in HeLa cells and a panel of probes containing all possible base combinations at the two central positions of each PuGGTCA motifs in the consensus ERE. Arrows indicate the main specific complexes. Binding of the wt ER $\alpha$  to the consensus ERE (GT) is shown for comparison in lane 17. (B) Quantitation of the levels of binding of the transfected receptors to the consensus ERE probe, expressed as bound over bound plus free probe. Results are an average of three experiments, and error bars indicate SD. (C) Levels of expression of the different transfected receptors as assessed by western analysis using the monoclonal B10 antibody.

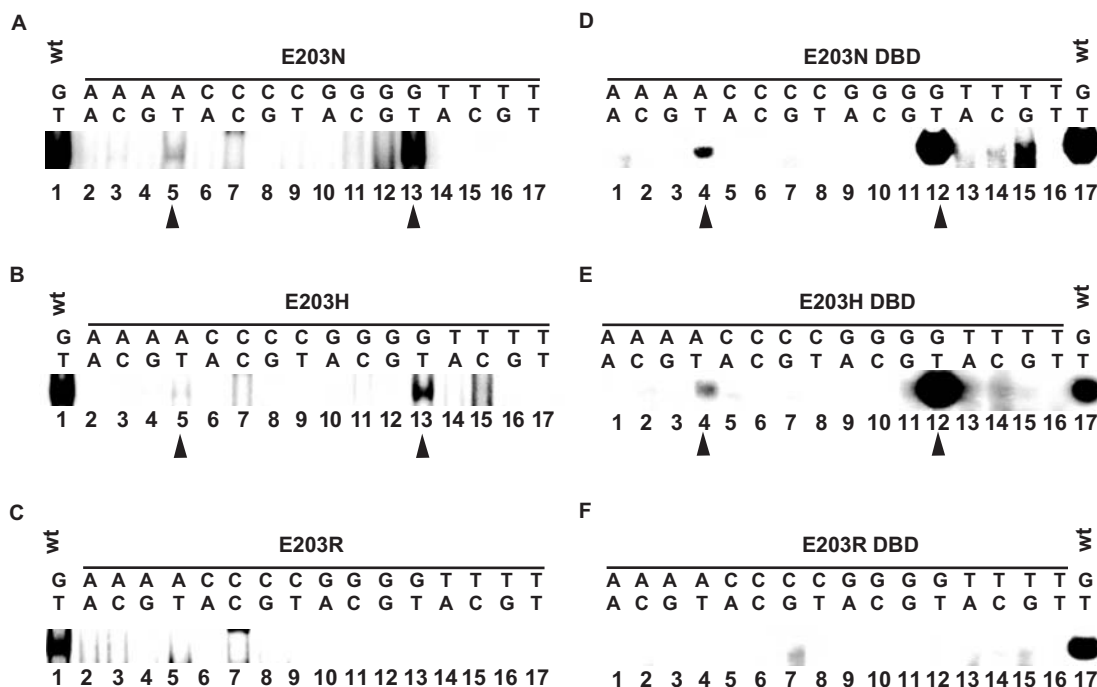
receptors E203N and E203H formed complexes mainly with the wt ERE (GT probe, Figure 6A and B, lanes 13 and Figure 6D and E, lanes 12). While binding to the wt ERE was not abolished, the patterns of probe recognition were altered with both mutants, which bound to the AT element (Figure 6A and B, lanes 5 and Figure 6D and E, lanes 4). These interactions are transcriptionally productive, as demonstrated by transient cotransfection of CAT reporter vectors containing the corresponding response elements cloned upstream of the thymidine kinase promoter with expression vectors for the different mutants (Figure 8B, ERE-tk-CAT and AT-tk-CAT

reporter vector). Titration curves were performed using varying concentrations of transfected plasmids, and protein levels were measured by western analysis (Figure 8A). Surprisingly, saturation was reached at identical protein concentrations for all receptors on either response element, indicating that the difference in efficiency of complex formation *in vitro* is not observable in our reporter assay (data not shown). This is possibly due to cooperative effects with other transcription factors bound to the promoter, or to chromatin organization. Peak transactivation levels were similar for the wt and mutant receptors on the consensus ERE, reflecting intact transcription activation properties for the mutants (Figure 8B). On the other hand, mutant E203H, but not E203N, had ~6-fold lower peak levels of transactivation on the AT element than on the consensus ERE (Figure 8B; peak levels on the two response elements were obtained at the same protein concentration). The differential levels of maximal transcriptional activation by the E203H mutant on the two response elements may be related to the previously reported allosteric effect of the DNA sequence on ER $\alpha$  transcriptional activation properties (38,39).

The observed DNA-binding specificity of these mutants do not correspond to predictions based on the proposed model, as no stable binding was observed with TN motifs for E203N (Figure 6A, lanes 14–17), or CN motifs with E203H (Figure 6B, lanes 6–9). Accordingly, the TT and CT elements did not confer estrogen responsiveness to the tk promoter in the presence of these mutants (data not shown). Note that no specific complexes were observed with the E203R mutant on any of the PuGNNCA probes (Figure 6C and F). Lack of binding to the consensus ERE and lack of transactivation on an ERE-tk-CAT reporter (Figure 8C) suggest that R at this position has a destabilizing effect that is stronger than the absence of side chain (A mutation, see Figure 5). Replacement of E203 by R in the structure of the ER–ERE complex reveals that the R side chain is too bulky to fit in the major groove of DNA, and that the amino groups exert repulsive effects with the positively charged groups of C+4 and C+5 and steric conflict with C+4 (Figure 9C and data not shown). In addition, neither binding to CN elements nor transactivation from reporter vectors containing the CT palindrome (Figure 8C, CT-tk-CAT reporter vector) was obtained, indicating again that the predicted switch in specificity has not occurred. These results indicate that a model based on a one amino acid—one base-pair relationship is not an accurate description of the interaction between the ER and its target response element, and suggest that K210 plays a role in modulating the DNA-binding specificity of receptors carrying mutations at position 203.

#### K210 restricts changes in DNA-binding specificity of mutants at position 203

Contrary to the total absence of binding observed with the E203R mutant of ER $\alpha$ , mutation of the corresponding amino acid in the AR (G577) to R led to a different pattern of response element binding than that of the wt receptor. While wt AR bound all four PuGNACA



**Figure 6.** Mutations of E203 do not generate expected switches in DNA binding specificity. (A, B and C) HeLa cells were transiently transfected with expression vectors for ER $\alpha$  mutant E203N (A) E203H (B) or E203R (C). Whole cell extracts were used in a gel shift assay with the sixteen PuGNNA probes and complexes were separated by electrophoresis on 5% polyacrylamide gels. The complexes formed are indicated by an arrowhead. For comparison, the complex formed between wt ER $\alpha$  and the consensus ERE (GT) is loaded on each gel (lane 1). (D, E and F) Similar assays were performed using bacterial extracts containing mutant ER DBDs carrying the E203N, E203H or E203R mutations.

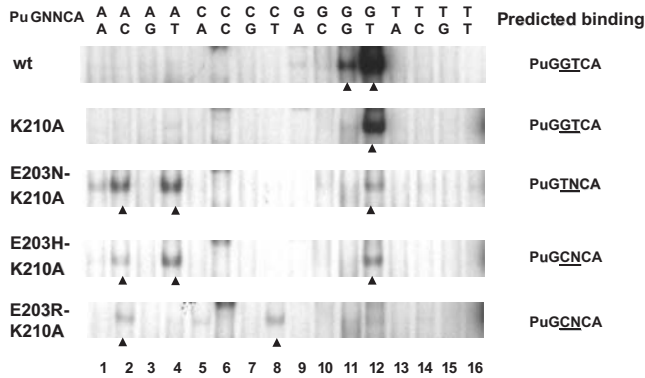
elements, the G577R mutant bound PuGGACA elements very weakly, but interacted with the three other PuGNACA elements, with a preference for the element containing a G at position +4 (PuGCACA). In the context of the GR DBD, and presumably also the AR DBD, the K residue corresponding to K210 (position 9 in the DNA recognition helix) does not bind DNA, but is involved in an interaction with E at position 13 in the DNA recognition helix (Figure 1B). Thus, we investigated whether mutation K210A may facilitate association of the E203 mutants to novel binding sites and/or reduce binding to the consensus ERE. The resulting E203N/K210A and E203H/K210A double mutants had a much reduced binding to this probe (Figure 7), confirming the role of K210 in binding to the consensus element in the absence of a residue at position 203 recognizing C+4. However, these mutants still did not form stable complexes with probes containing bases predicted to interact with the N or H residue at position 203 (TN, CN, respectively, see Figure 7).

In addition to complexes with AT palindromes already observed with the single mutants, the strongest complexes detected with E203N/K210A and E203H/K210A double mutants were with the AC element (Figure 7). On the other hand, the double mutant E203R-K210A gained binding to the CT element (Figure 7), as could be predicted from chemical compatibility between R at position 203 and G+4 (Figure 1D). This mutant also bound to the AC element (Figure 7). Thus, the specificity of base recognition expected from replacing the

E203 residue by R was revealed in the presence of the K210A mutation, although an additional unpredicted complex was also formed with comparable efficiency. As the level of complex formation on the consensus ERE, we examined whether the interaction between the E203R-K210A mutant and the CT probe is transcriptionally productive. Whereas no estradiol-induced transcription could be detected with wt, K210A or E203R on a CT-tk-CAT reporter vector, the double mutant E203R-K210A gave rise to a detectable increase in estradiol-stimulated transcription (Figure 8C). The double mutant, like the single mutant E203R, was not active on ERE-tk-CAT, confirming the switch in specificity. The complete switch in DNA-binding specificity of the double mutant was confirmed using reporter vectors containing tandem response elements. No transactivation of the reporter vector containing EREs was observed in the presence of the double mutant after estrogen treatment, while peak stimulation of the reporter vector containing CT elements was comparable to that of wt ER $\alpha$  on the reporter containing consensus EREs (Figure 8D).

## DISCUSSION

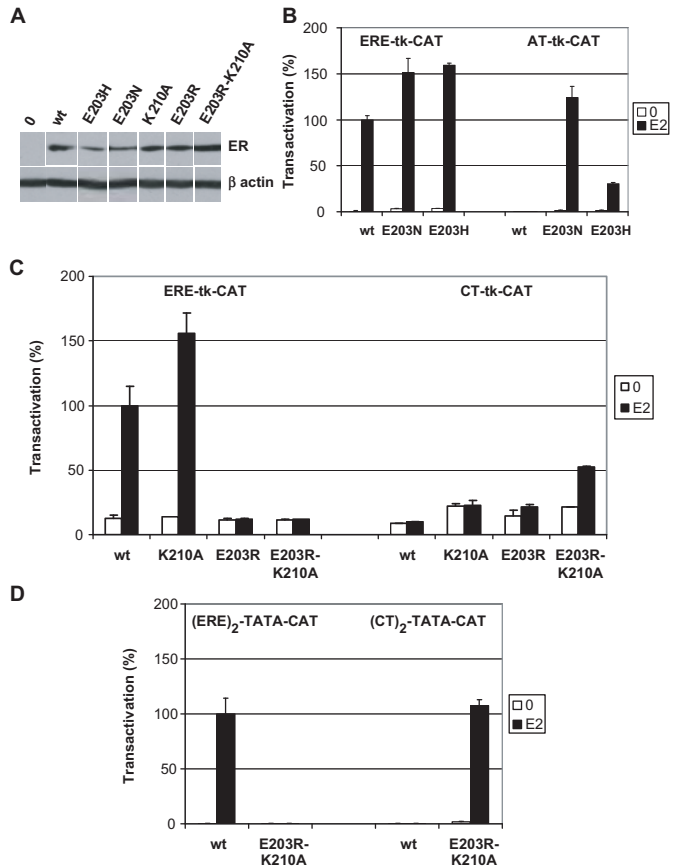
Although C2H2 zinc fingers can be tailored to bind virtually any DNA sequence, nuclear receptors have not demonstrated similar flexibility. A possible reason for success in the rational design of artificial C2H2 zinc finger



**Figure 7.** Mutation K210A introduced in E203 mutants reduces binding to the consensus ERE and reveals the switched specificity of mutant E203R. (A) Gel shift assays performed with double mutants of ER $\alpha$  expressed in HeLa cells and the panel of 16 probes containing all possible base combinations at the two central positions of each PuGGTCA motifs in the consensus ERE. Arrows indicate the main specific complexes formed. Note that similar levels of expression were obtained in western analysis (not shown).

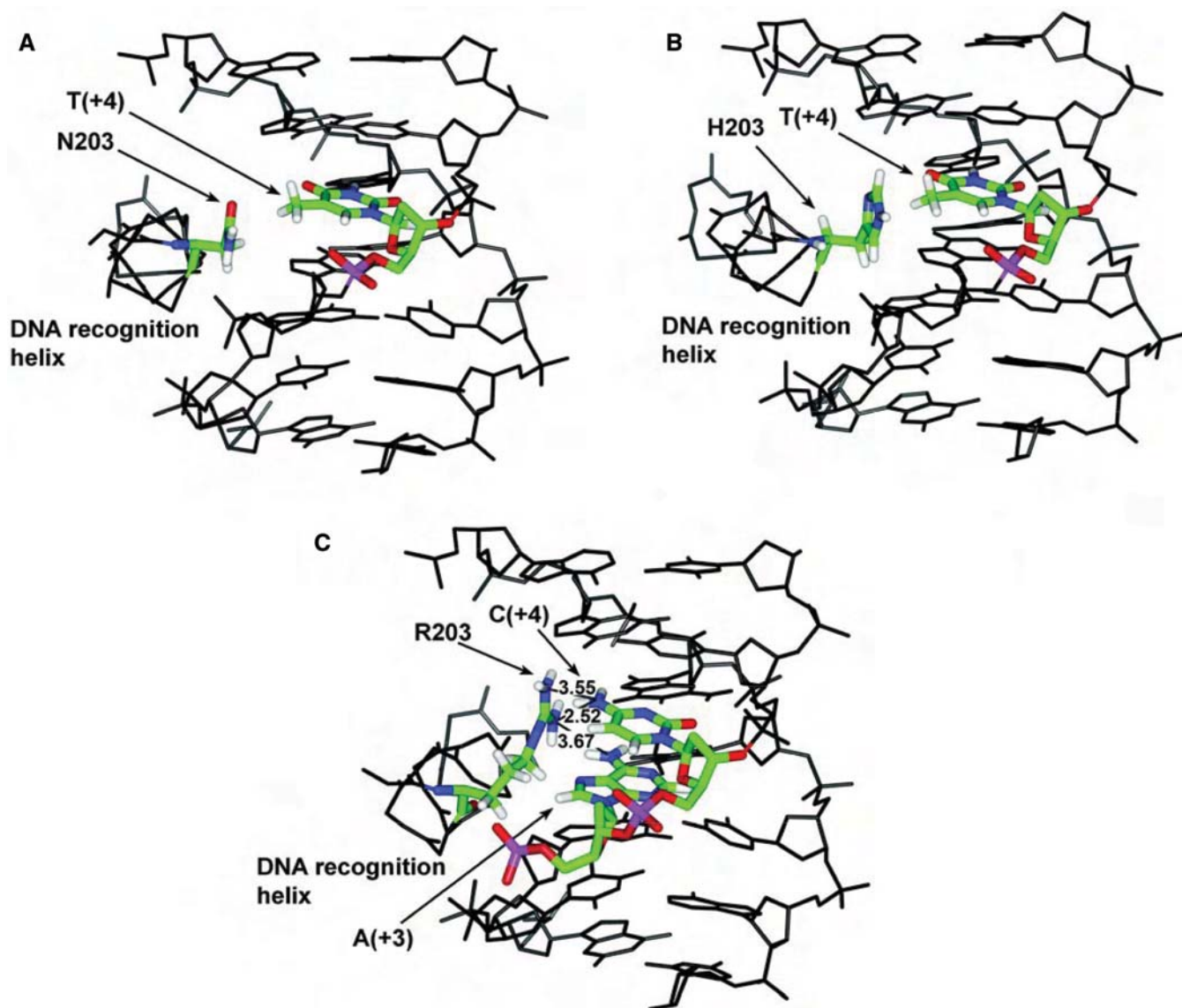
proteins is the modular structure of this type of DBDs, each finger recognizing three base pairs and multiple zinc fingers extending the length of bound DNA. On the other hand, steroid receptors bind DNA as dimers recognizing palindromic response elements. As dimerization contributes to the affinity of DNA binding, binding to non-palindromic sequences would likely be of low affinity. Nevertheless, the question remains whether steroid receptors can bind other DNA elements than their two natural cognate response elements. A previously proposed model for prediction of specific amino acid–base interactions by the steroid receptor DNA-binding helix (8) incorporates both chemical rules governing amino acid–base interactions and stereochemical constraints resulting from the position of the DNA recognition helix in the major groove of response element as determined by crystallographic studies. However, this model relies on one amino acid—one base-pair relationships and ignores some of the contacts described in the ER–ERE cocrystal structure. In particular, E203 recognizes not only the base at position +4 (Figure 1C, bold line), but also that at position +3 (dotted line), and bases on the opposite strand make contacts with K210. On the other hand, the lysine residue corresponding to K210 in the context of the GR does not bind DNA, and its role in binding of ERs to EREs has not been experimentally confirmed.

Contrary to the GR and AR, which recognize motifs with variable base composition at position –4 conforming to the PuGNACA consensus (20), ERs display a high degree of specificity for bases at position –4/–3. GT was the only element bound with high affinity, while GG was tolerated when introduced in only one motif, such as in the ERE found in the promoter of the rabbit uteroglobin gene (40), but reduced binding efficacy dramatically when introduced in both motifs. This binding pattern is consistent with chemical preferences of E203 for C or A at position +4 and +3, and of K210 for G or T at position –4 and –3, with restrictions imposed by steric constraints



**Figure 8.** Altered patterns of reporter vector transactivation by ER mutants. HeLa cells were transiently transfected with variable concentrations of expression vectors for the wt ER $\alpha$  or mutants (10 ng 3  $\mu$ g per 10 cm plate), tk CAT reporter vectors containing consensus ERE, AT or CT elements (2  $\mu$ g per plate), and an internal control CMV  $\beta$ Gal reporter vector (2  $\mu$ g per plate). Cells were treated with estrogen or vehicle for 40 h and duplicate extracts were assayed ER protein expression levels in western analysis and for  $\beta$  galactosidase/CAT activity. (A) Standardized expression levels of wt ER and different mutants. Note that some mutants (E203N and E203R K210A) were transfected at a 3 fold higher concentration (3  $\mu$ g) than other expression vectors (1  $\mu$ g) to obtain similar expression levels. (B) CAT activity of wt, E203N and E203H, shown at peak transactivation levels for all plasmids (corresponding to 300 ng for wt and E203H and 1  $\mu$ g for E203N). (C) Same as in B, except that expression vectors for wt or the K210A, E203R or E203R K210A mutants were used together with tk CAT reporter vectors containing the consensus ERE or the CT element. Peak transactivation was obtained at 300 ng (wt or K210A) or 1  $\mu$ g (E203R K210A). Other plasmids (K210A, E203R), used here at 300 ng, were inactive even at the highest tested concentration (3  $\mu$ g; not shown). (D) Same as in C except that expression vectors for the wt ER or the E203R K210A mutant were used together with TATA CAT reporter vectors containing two copies of the consensus ERE or the CT element. Maximal transactivation levels, obtained at 1  $\mu$ g (wt) or 3  $\mu$ g (E203R K210A), are shown.

with either amino acids. Mutagenesis of each amino acid indicated that both contribute to recognition of the two central base pairs in terms of binding efficiency. E203 also plays a specific role in restricting binding to AT elements, since mutation E203A, but not K210A, allowed formation of complexes. Molecular modeling indicates that this is due to steric conflicts between the carbonyl group of E203 and the methyl group of thymine +4.



**Figure 9.** Modeling of the effect of mutations at position 203 on interaction with palindromic response elements. (A and B) Complexes formed between the ER mutant E203N (A) or E203H (B) and the AT element after replacement of E203 by N or H in the ER $\alpha$ DBD/ERE crystal structure and energy minimization. The position of the N and H side chains are restrained by the presence of S193. (C) Steric conflicts and charge repulsion with the amino groups of C+4 in the consensus response element resulting from replacement of E203 by R.

The contribution of K210 to ERE binding likely explains the fact that E203N and E203H mutants still interacted with high affinity with the consensus response elements (GT). Interactions with the AT element, which were not predicted by the proposed model, were observed in gel shift and transactivation assays with both E203N and E203H mutants, and likely result from removal of negative constraints exerted by E203 on T+4, as observed also in the E203A mutant. Our modeling indicates that the methyl group of thymine can be accommodated by side chain rearrangement when E203 is replaced by N or H (Figure 9A and B). On the other hand, lack of binding of the E203R mutant to all tested elements and of transcriptional activity on the consensus ERE and CT element can be explained by conflicts in charge

preference between R203 and K210 for recognition of the same base pairs.

The role of K210 in preventing a specificity switch by mutations at position 203 is demonstrated by the observation that the double mutant E203R-K210A could bind the CT element, as predicted by base compatibility between R and G+4, whereas this interaction was not observed with the single mutation E203R. As noted above, the K residue in AR at the corresponding position does not contact DNA, explaining the capacity of the AR mutant with an R at the position equivalent to 203 to interact with G+4. Another difference between the two receptors is the contribution of V at position 6 in the DNA recognition helix of AR (Figure 1B) in complex stabilization. This may explain the relatively low affinity of the

E203R-K210A mutant for the CT element. However, this interaction was transcriptionally productive. Surprisingly, similar levels of transactivation were obtained with the mutant receptor on the CT element as with the wt receptor on the consensus element at comparable protein concentrations along a range of amounts of transfected plasmids, failing to reveal a different efficiency of reporter DNA saturation (data not shown). Titration curves of mutant E203N and E203H on the consensus ERE and AT element also failed to reveal a shift in protein concentrations necessary to reach peak transcriptional activity. This indicates that our *in vivo* assay may not discriminate between binding sites in the range of affinities that is observable in gel shift assay (within 30-fold of wt ER $\alpha$ -consensus ERE affinity) and may be due to synergism with other transcription factors for binding to our reporter genes *in vivo*. A higher stringency of *in vitro* versus *in vivo* assays is supported by the observation that half-palindromes, which are not bound in our gel shift assay, are enriched, albeit to a much lower degree than high-affinity EREs, in chromatin fragments bound by ER $\alpha$  in a genome-wide analysis (15). On the other hand, our transactivation data confirms the total loss of interaction between the E203R-K210A and the consensus ERE and thus the switch in specificity toward the CT element.

Binding of the E203R-K210A to some unpredicted sites, i.e the AC element, reflects the limitations of simple models in fully accounting for the complex interactions between these residues and the two central base pairs. In addition, the expected binding of the E203H-K210A mutant to the CN palindromes and of the E203N-K210A mutant to the TN elements were not observed. Replacement of E203 by N or H reveals that both residues are too short to interact with charged groups at position 6 or 7 of A (+4) or G (+4), respectively (Figure 9A and B). Finally, mutants E203H-K210A or E203N-K210A still bound the consensus ERE (GT element), contrary to what was observed with mutation E203R-K210A. The total abrogation of binding to the consensus ERE appears due to charge and steric conflict of R with C +4 (Figure 9C).

Together, our results indicate that simple chemical and stereochemical rules cannot predict accurately the changes in the selectivity of ER–DNA interactions induced by specific mutations in the two central base pairs. A clear limitation is the need to incorporate the contribution of several amino acids to recognition of the same base pairs, and the role of one amino acid in recognizing two adjacent bases. The combined effects of E203 and K210 in interacting with the same bases is apparent both at the level of charge and steric constraints, resulting in the tighter DNA-binding specificity for the two central base pairs observed for ER versus other steroid receptors. Further, steric constraints play an important role in preventing potential interactions. Additional experiments will also be necessary to determine whether the effect of amino acid replacement at other positions in the ER $\alpha$  DNA-binding helix, which are involved in simpler one residue–one base interactions, is more easily predictable. It remains possible that other receptors may be more amenable to the rational design of mutant receptors with

altered DNA-binding specificity, due to differences in composition of the DNA-binding helix and/or in the mode of DBD dimerization. In this respect, it will be of interest to investigate the DNA-binding specificity of non-classical *C. elegans* receptors, which contain widely diverging combinations of amino acids in their DNA recognition helix. Finally, combinatorial approaches as performed for C2H2 zinc fingers (41,42) may help clarify how amino acids of the DNA-binding helix cooperate toward the establishment of novel DNA-binding specificities.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to S.M. J.D. has been supported by an FRSQ fellowship, and V.N.D. by a studentship from the Montreal Centre for Experimental Therapeutics in Cancer—Canadian Institutes for Health Research teaching program. S.V.S. is a CIHR scientist, and S.M. is an FRSQ Chercheur-Boursier Senior and holds the CIBC Breast Cancer Research Chair at Université de Montréal. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by NSERC.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Green,S. and Chambon,P. (1988) Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.*, **4**, 309–314.
- Beato,M. and Klug,J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update*, **6**, 225–236.
- Glass,C.K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Endocr. Rev.*, **15**, 391–407.
- Rastinejad,F., Perlman,T., Evans,R.M. and Sigler,P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, **375**, 203–211.
- Khorasanizadeh,S. and Rastinejad,F. (2001) Nuclear receptor interactions on DNA response elements. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 384–390.
- Baumann,H., Paulsen,K., Kovacs,H., Berglund,H., Wright,A.P., Gustafsson,J.A. and Hard,T. (1993) Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Biochemistry*, **32**, 13463–13471.
- Schwabe,J.W., Chapman,L., Finch,J.T. and Rhodes,D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, **75**, 567–578.
- Klein Hitpass,L., Ryffel,G.U., Heitlinger,E. and Cato,A.C. (1988) A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 647–663.
- Driscoll,M.D., Sathya,G., Muyan,M., Klinge,C.M., Hilf,R. and Bambara,R.A. (1998) Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29321–29330.
- Kulakosky,P.C., McCarty,M.A., Jernigan,S.C., Risinger,K.E. and Klinge,C.M. (2002) Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *J. Mol. Endocrinol.*, **29**, 137–152.
- Walker,P., Germond,J. E., Brown Luedi,M., Givel,F. and Wahli,W. (1984) Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen responsive vitellogenin and apo VLDLII gene. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8611–8626.

12. Klinge, C.M. (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2905-2919.
13. Sanchez, R., Nguyen, D., Rocha, W., White, J.H. and Mader, S. (2002) Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays*, **24**, 244-254.
14. Bourdeau, V., Deschenes, J., Metivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J.H. and Mader, S. (2004) Genome wide identification of high affinity estrogen response elements in human and mouse. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1411-1427.
15. Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoutte, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C. *et al.* (2006) Genome wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet.*
16. Klock, G., Strahle, U. and Schutz, G. (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature*, **329**, 734-736.
17. Nordeen, S.K., Suh, B.J., Kuhnel, B. and Hutchinson, C.A. (1990) Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol. Endocrinol.*, **4**, 1866-1873.
18. Robinson Rechavi, M., Escrivá Garcia, H. and Laudet, V. (2003) The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.*, **116**, 585-586.
19. Nguyen, D., Steinberg, S.V., Rouault, E., Chagnon, S., Gottlieb, B., Pinsky, L., Trifiro, M. and Mader, S. (2001) A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1790-1802.
20. Mader, S., Kumar, V., de Verneuil, H. and Chambon, P. (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid responsive element. *Nature*, **338**, 271-274.
21. Umesono, K. and Evans, R.M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, **57**, 1139-1146.
22. Danielsen, M., Hinck, L. and Ringold, G.M. (1989) Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell*, **57**, 1131-1138.
23. Mader, S., Chambon, P. and White, J.H. (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1125-1132.
24. Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R. and Sigler, P.B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*, **352**, 497-505.
25. Sera, T. and Uranga, C. (2002) Rational design of artificial zinc finger proteins using a nondegenerate recognition code table. *Biochemistry*, **41**, 7074-7081.
26. Blancafort, P., Segal, D.J. and Barbas, C.F.III. (2004) Designing transcription factor architectures for drug discovery. *Mol. Pharmacol.*, **66**, 1361-1371.
27. Mandell, J.G. and Barbas, C.F.III. (2006) Zinc Finger Tools: custom DNA binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res.*, **34**, W516-523.
28. Papworth, M., Kolasinska, P. and Minczuk, M. (2006) Designer zinc finger proteins and their applications. *Gene*, **366**, 27-38.
29. Suzuki, M. and Yagi, N. (1994) DNA recognition code of transcription factors in the helix turn helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12356-12361.
30. Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I. and Chambon, P. (1989) The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *EMBO J.*, **8**, 1981-1986.
31. Barsalou, A., Gao, W., Anghel, S., Carriere, J. and Mader, S. (1998) Estrogen response elements can mediate agonist activity of antiestrogens in human endometrial Ishikawa cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17138-17146.
32. Banerji, J., Rusconi, S. and Schaffner, W. (1981) Expression of a beta globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, **27**, 299-308.
33. Pearlman, D.A., Case, D.A., Caldwell, J.W., Ross, W.S., Cheatham, T.E.I., Ferguson, D.M., Seibel, G.L., Singh, U.C., Weiner, P.K. *et al.* (1995) AMBER 4.1 University of California, San Francisco, CA, USA.
34. Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. *et al.* (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, **389**, 753-758.
35. Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M. and Chambon, P. (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.*, **5**, 891-897.
36. Mader, S., Leroy, P., Chen, J.Y. and Chambon, P. (1993) Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J. Biol. Chem.*, **268**, 591-600.
37. Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1993) The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J.*, **12**, 5029-5041.
38. Wood, J.R., Greene, G.R. and Nardulli, A.M. (1988) Estrogen response elements function as allosteric modulators of estrogen receptor conformation. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 1927-1934.
39. Hall, J.M., McDonnell, D.P. and Korach, K.S. (2002) Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 469-486.
40. Slater, E.P., Redeuilh, G., Theis, K., Suske, G. and Beato, M. (1990) The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol. Endocrinol.*, **4**, 604-610.
41. Choo, Y. and Klug, A. (1994) Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 11163-11167.
42. Magnenat, L., Blancafort, P. and Barbas, C.F.III. (2004) *In vivo* selection of combinatorial libraries and designed affinity maturation of polydactyl zinc finger transcription factors for ICAM-1 provides new insights into gene regulation. *J. Mol. Biol.*, **341**, 635-649.





**ARTICLE 2**



## Limits to the rational design of estrogen receptor mutants with altered DNA-binding specificity

*Virginie N. Dupont, David Laperrière, Martine Bail, Sergey V. Steinberg and Sylvie Mader*

### CONTRIBUTION DES AUTEURS :

---

- *Virginie N. Dupont* a conçu, réalisé et analysé toutes les expériences\* de l'étude sous la supervision du *Dr. Sylvie Mader*. Conception de toutes les figures\* et relecture du manuscrit.

\*à l'exception des figures de bio-informatique 2B et 6, ainsi que de la figure de modélisation moléculaire 8.

- *David Laperrière* a réalisé les analyses bio-informatiques donnant lieu aux figures 2B et 6.
- *Martine Bail* a participé à l'obtention des vecteurs rapporteurs luciférase, des mutants K206A, R211K et K206A-R211A et à des expériences de gels shift (non montrées).
- *Sergey V. Steinberg* a réalisé la modélisation moléculaire.



# ARTICLE 2

## LIMITS TO THE RATIONAL DESIGN OF ESTROGEN RECEPTOR MUTANTS WITH ALTERED DNA BINDING SPECIFICITY

Virginie N. Dupont<sup>1,2</sup>, David Laperriere<sup>1,2</sup>, Martine Bail<sup>1,2</sup>, Sergey V. Steinberg<sup>1</sup> and  
Sylvie Mader<sup>1,2\*</sup>

[REDACTED]

\* To whom correspondance should be addressed at: [REDACTED]

[REDACTED]

### *ABSTRACT*

Cells' ability to regulate estrogen target-gene transcription relies, in a large part, on ER $\alpha$  DNA binding. Estrogen receptor alpha binds to palindromic response elements composed of PuGGTCA motifs. We have previously shown that rational design of ER mutants with altered DNA binding specificity is complicated by the mode of recognition of the two central base pairs of DNA motifs, which involves two amino acids E203 and K210 each interacting with two bases on opposite DNA strands. Combined mutagenesis of these residues was required to generate a receptor that recognized a new type of motifs.

Here we investigated whether ER $\alpha$  can be designed to recognize new bases at positions +2 and -5. R211 residue cannot be altered without a complete loss of DNA binding in gel shift and transactivation assays. This likely clarifies both the total conservation of this residue within the nuclear receptor family and of G+2 in naturally-occurring ERE motifs. This crucial contribution to DNA binding affinity is not only due to hydrogen bonding, but also results from packing of the terminal end of its side chain both with DNA and the backbone of the receptor DNA recognition helix.

Conversely, mutagenesis of K206 indicated that while its contribution to the affinity of the interaction is more minor than that of R211. Short residues at this position relaxed the ER $\alpha$  specificity towards the corresponding base. Whereas replacement of K206 by longer, either hydrophobic or acidic residues displaced the binding of DNA motifs with any bases at position -5, likely due to the additional bulk of their branched side chains. Also, modeling indicated that the charge of K206 is also important to stabilize the positioning of neighboring E203. These results indicate that packing interactions involving bases and amino acid side chains contribute as much, if not more, than chemical complementarity to DNA binding specificity, and suggest that combined changes in several residues of the DNA binding helix may be necessary to achieve switches in specificity with efficient transactivation.

## INTRODUCTION

Nuclear receptors, as ligand-inducible transcription factors, play an essential role in gene regulation, binding to multiple target sequences and tightly regulating multiple genes in a complex manner. As a result, they are implicated in almost all aspects of normal or pathologic human physiology, then constituting important therapeutic targets. In this context, the detailed understanding of nuclear receptors has major implications.

Members of the nuclear receptor superfamily are present in all metazoans. Human cells contain 48 functional nuclear receptors, while *Drosophila melanogaster* has 21. However, this family underwent an explosive expansion and divergence in *Caenorhabditis elegans* with 284 members (Antebi 2006). More precisely, *C. elegans* has 233 hormone receptors which represent nearly 1.5% of its entire coding sequence (Clarke *et al.* 1998). Of their 284 nuclear receptors, only fifteen have homologs in other species, including relatives of the mammalian HNF4, PNR or TLX as well as the *D. melanogaster* DHR-38 or E78 (Robinson-Rechavi *et al.* 2005). The fact that unicellular organisms, such as *Saccharomyces cerevisiae*, do not contain any nuclear receptor might be relevant to the evolution of multicellular animals. It has been proposed that hormone receptor emergence have been a key event in the development of cell-cell communication and the origins of multicellularity in metazoan (Laudet *et al.* 1992).

Nuclear receptors are defined by their highly conserved modular organization. They consist of 6 regions of sequence homology organized in three main functional domains. The most conserved regions, the DNA binding domain (DBD)(containing the DNA recognition helix) and the transcriptional activation domains (AF) allow nuclear receptors to act as transcription factors. On the other hand, their ligand binding domain (LBD) allows the control of the receptors by small lipophilic signaling molecules. According to these properties, the hormonal receptor ER $\alpha$

(estrogen receptor alpha) is a ligand-inducible zinc finger transcription factor, which plays a fundamental role in both normal reproductive gland development and breast cancer carcinogenesis, and also represent a critical molecular target for breast cancer therapy (Beato *et al.* 2000; Green *et al.* 1988; Nguyen *et al.* 2007).

In the absence of hormones, most of the hormonal nuclear receptors are mainly found in the nucleus, in inhibitory complexes with heat shock proteins and immunophilins (Ylikomi *et al.* 1998). The 17 $\beta$ -estradiol (E2) is a lipophilic hormone which passes through the cell membrane to bind ER $\alpha$  in the nucleus. Its binding induces ER $\alpha$  conformational changes, releasing it from the inhibitory complex, and its homodimerization.

ER $\alpha$  homodimers bind specific DNA sequences: estrogen response elements (EREs) in promoters of E2 target genes (Driscoll *et al.* 1998; Klein-Hitpass *et al.* 1988; Kulakosky *et al.* 2002). The consensus ERE (EREcs), a palindrome of PuGGTCA motifs with a three base pair spacer, is the site of highest affinity for the receptor *in vitro*. The recruitment of co-activators and the basal transcriptional machinery stabilize the ER $\alpha$ -ERE complex and allow target gene transcription in response to E2 signaling. Consequently, nuclear receptor specific binding to DNA is a crucial step in the response of cells to external stimuli.

In that regard, these last years, lots of researchers have concentrated their efforts on identifying ER $\alpha$  binding sites (Bourdeau *et al.* 2004; Carroll *et al.* 2005; Lin *et al.* 2007). Surprisingly, EREs are bound in regions sometimes far away from the regulated gene (-10kb/+5kb) (Bourdeau *et al.* 2004; Carroll *et al.* 2005). In addition, most of the estrogen-regulated genes contain imperfect or non palindromic EREs (Gruber *et al.* 2004; Klinge 2001; O'Lone *et al.* 2004). Most of them contained at least 4/5 nucleotides of the consensus ERE motif (Dana *et al.* 1994). However, the more the EREs diverge from the consensus sequence, the lower ER $\alpha$  binding affinity and transcriptional activity (Klinge 2001). Nevertheless, the molecular basis of ER $\alpha$  selective binding to EREs remains unclear. Even if, a lot of bio-informatic models has been generated in order to elucidate protein-DNA interaction through AA-base



recognition codes, sequence bases profiles, or physical models of interaction, only a few experimental studies has been published.

Nuclear receptor binding on their DNA response elements depends on 2 criteria: the DNA sequence of the motif recognized and the dimerization mode of the nuclear receptors. Nuclear receptors only bind two main motifs: PuG<sup>A</sup>/<sub>T</sub>ACA motifs are recognized by PRs, ARs, MRs, and GRs (receptors for progesterone, androgen, mineralocorticoids and glucocorticoid, respectively); whereas PuG<sup>G</sup>/<sub>T</sub>TCA motifs are selectively bound by ERs and other receptors such as PPARs (peroxisome proliferator receptors) or RXR (retinoid-X-receptor) (Table 1) (Baumann *et al.* 1993; Bourdeau *et al.* 2007; Deschenes *et al.* 2007; Klock *et al.* 1987; Nordeen *et al.* 1990). Despite, the same motifs are bound by several receptors, specificity of DNA binding is achieved through organization of the motif repetition: in direct repeats, palindromes or inverted palindromes, linked to the dimerisation mode of the receptors (Glass 1994; Khorasanizadeh *et al.* 2001; Rastinejad *et al.* 1995). Steroid receptors bind palindromic organized motifs as homodimer whereas RXR forms heterodimers, with PPAR for example, and bind direct repeats such as AGGTCA<sub>n</sub>AGGTCA (Table 1). Homodimers of ER $\alpha$  binds EREcs, PuGGTCAnnnTGACCPy, each ERE motif is contacted by the DBD of a single monomer. The two C4 zinc fingers of the DNA recognition helix, of ER $\alpha$  DBD, make specific and non-specific contact with the bases of the major groove of DNA and its sugar-phosphate backbone (Schwabe *et al.* 1993). Both the DNA recognition helix and the dimerization interface contribute to the specificity of DNA binding (Danielsen *et al.* 1989; Mader *et al.* 1993 ; Umesono *et al.* 1989). More precisely, the second zinc finger is involved in the ERE motif spacing recognition and ER $\alpha$  dimerization (Baumann *et al.* 1993 ; Martinez *et al.* 1989; Schwabe *et al.* 1993).

Amino acid sequence of the DNA recognition helix is highly conserved through steroid receptors, which partially explain the fact that there are only 2 main DNA motifs recognized (Table 1). The few variations observed in the base-contacting amino acids of human nuclear receptors suggest that their protein-DNA recognition has been conserved throughout evolution, possibly because it affords the most

favorable combination of affinity and selectivity (Robinson-Rechavi *et al.* 2003). According to the broad expansion of *C. elegans* nuclear receptors, their DNA recognition helices contain a much wider variety of amino acid composition (Table 1).

Crystallographic analyses of a dimer of ER $\alpha$  DBDs bound to its response element have uncovered the amino acid base pair interactions (Schwabe *et al.* 1993). ERs specific recognition of EREs is supported by a small number of specific direct interactions established by 4 amino acids of the DNA recognition helix: E203, K206, K210 and R211 (Table 1 in bold blue and fig. 1A). The basic amino acids K206 et R211 contact G-5 and G+2 of the consensus ERE, respectively, while E203 and K210 interact with the 2 central base pairs GT -4/-3 or CA +4/+3 on both strand of the DNA motif.

As ER $\alpha$ , the DNA motif recognition specificity by steroid receptors is determined by a small number of specific interactions. Thus altering the identity of the base-interacting amino acids may thus be expected to change the selectivity of receptor/DNA interaction. For example, mutations in the DNA recognition helix of the human GR or AR induce modified DNA binding selectivity (Mader *et al.* 1989; Nguyen *et al.* 2001). Mutating the 3 amino acids of ER $\alpha$  P-box (E203, G204 and A207, fig. 1A) into the ones of GR allows the chimeric receptor to recognize GR DNA response elements in response to E2 stimulation (Mader *et al.* 1989). In addition, AR natural mutation of the amino acid G577R of the recognition helix, corresponding to G203 of ER $\alpha$ , alters AR-DNA binding specificity (Nguyen *et al.* 2001). More particularly, we have previously demonstrated that the mutation of E203 or K210 alters ER $\alpha$  DNA recognition specificity (Nguyen *et al.* 2007). In addition, only combined mutagenesis generates a receptor that recognized a new type of motif. Of notes, even if VDR, GR or AR DBD natural mutations exist, no natural mutants of ER DBD has been identified yet, suggesting that such receptors are not viable (Gewirth *et al.* 1995; Nguyen *et al.* 2001; Zilliacus *et al.* 1992).

DNA recognition relies on a few amino acids and their mutations expected to modify DNA selectivity, thus bio-informatic predictive models have been built.

Specifically, a computational model for the selectivity of transcription factor/DNA interactions was built (Suzuki *et al.* 1994). First, chemical rules list all the possible pairing between the 20 amino acids and the 4 bases through hydrogen bonding and hydrophobic interaction. Chemical merit points, reflecting the binding energy of each interaction between an amino acid and a base, were then calculated. In addition, residues were classified according to the size of their side chain. Those rules are applicable to all protein-DNA interactions. On the contrary, stereochemical rules, based on their crystallographic structures, and corresponding merit points are specific to each transcription factor family. They characterized the exact set of amino acids and bases in contact. Finally, taking into account the chemical and stereochemical merit points, a binding score was calculated for each pair of amino acid-base. This binding score reflects the match between a base and an amino acid in a given position in the DNA recognition helix of the transcription factor. According to the authors, “the rules are specific enough to predict DNA-binding characteristic from a protein sequence” then constituting a DNA-recognition code (Suzuki *et al.* 1994). However, simplifications must have been used: (i) over several sets of possible contacts between a given protein and DNA sequences, only the binding with the highest score was kept; (ii) only one contact between one amino acid and one base was taken in account; (iii) finally in the case of ER $\alpha$ , not all amino acids that come in contact with DNA were taken into account. These simplifications explain, in part, why the model did not adequately predict changes in the specificity of ER $\alpha$  mutants affected in amino acids E203 and K210 (Nguyen *et al.* 2007). Each of these amino acids interacts with the two central base pairs of the ERE on the opposite strands of the DNA. Since we are presently studying the simpler case of K206 and R211 contacting 2 distinct bases G-5 and G+2, respectively, the model should allow us to predict the mutant behavior. However, K206 was not included in the recognition code, so only the chemical rules will be considered.

The family of zinc finger transcription factors includes proteins with C2H2 zinc finger. In their case, changing the key residues implicated in base interactions is sufficient to alter DNA-binding specificity. This property allow the design of zinc finger proteins that recognized specific sequences of DNA (9 to 18 base pairs)

(Blancafort *et al.* 2004; Mandell *et al.* 2006; Papworth *et al.* 2006; Sera *et al.* 2002) (Choo *et al.* 1994; Jamieson *et al.* 1994; Rebar *et al.* 1994). A recognition code is used to design the proteins even if the predictions are not “absolute”. This powerful tool has been used to do genetic reprogramming of tumor cells and in gene correction therapy against X-link severe combined immune deficiency (Blancafort *et al.* 2005; Urnov *et al.* 2005). Since human nuclear receptors present little variability in base-contacting amino acids, it remains unclear whether the DNA recognition helix of C4 zinc finger transcription factors can be modified to bind with high affinity desired DNA response motifs. Although, in a previous study, we have shown that rational design of ER $\alpha$  mutants with altered DNA binding specificity is complicated by the mode of recognition of the two central base pairs of DNA motifs, Mutation of the ER $\alpha$  E203 of the DNA binding helix can result in specific recognition of C at position -4 of the motif by ER $\alpha$ , although additional replacement of K210 by alanine was necessary to remove charge conflicts (Nguyen *et al.* 2007).

In this study, we have addressed the question whether targeting the two positions K206 and R211 that contribute to the DNA binding specificity of nuclear receptors through simple one amino acid one base interactions can lead to the generation of mutant receptors with altered DNA binding specificity through rational design.

## ***MATERIAL AND METHODS***

### ***Plasmids***

The wild-type ER $\alpha$  expression vector pSG1-HE80 has been described previously (Mader *et al.* 1993). Expression vectors for mutants of ER $\alpha$  at position 206 or 211 were constructed by site-directed mutagenesis of pSG1-HE80 using the **QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit** according to the instructions of the manufacturer (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

The TATA-LUC reporter plasmids containing one copy of the consensus ERE or of palindromes containing symmetric base replacements were derived from the pGL3-Basic vector (Promega, Madison, WI, USA) first by insertion of the minimal promoter Ad2MLP and second by ligation of double stranded oligonucleotides containing the response elements flanked with BamHI-BglII in the BglII site.

### ***Cell culture and transfection***

HeLa cells were maintained in DMEM (Wisent, St-Bruno, Qc, Canada) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, On, Canada). Three days before experiments, HeLa cells were switched to phenol red-free DMEM containing 5% charcoal-stripped FBS, 1% sodium pyruvate (Wisent), 1% penicillin/streptomycin (Wisent) and 1% L-glutamine (Wisent).

For gel shift assays, 2 million cells were transiently transfected with ER expression vectors (5  $\mu$ g completed to 15  $\mu$ g with carrier salmon sperm DNA (Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada) in 10 cm dishes) using the PEI (polyethylenimine) method (Boussif *et al.* 1995).

For luciferase assays, HeLa cells were plated in six-well plates ( $25 \times 10^4$  cells per well) and treated with E2 (25 nM) or vehicle. Cells were transfected in triplicates for each treatment using the PEI method with 100 ng expression vectors for wt ER $\alpha$  or for different ER $\alpha$  mutants, 2  $\mu$ g pCMV- $\beta$ Gal and 2  $\mu$ g TATA-Luc

reporter vectors containing single copies of different palindromic response elements. DNA mixes were completed to 15 µg with carrier salmon sperm DNA. Cells were transfected in parallel for luciferase and immunoblot assays in 10 cm dishes (1.5x10<sup>6</sup> cells per dish).

### ***Gel shift assays***

Two days post-transfection, transfected HeLa cells were treated for one hour with 25 nM estradiol and harvested in ice-cold PBS. Whole cell extracts were prepared by three cycles of freeze-thawing in extraction buffer (Tris HCl pH 7.6, 20 mM; glycerol 20%; KCl 500 mM; DTT 1 mM; EDTA 0.1 mM; PMSF 10 mM and protease inhibitors) followed by centrifugation for 10 minutes at 13,000 g (Nguyen *et al.* 2007). Protein concentrations in whole cell extracts were adjusted using a Bradford assay. Cell extracts were diluted to a final KCl concentration of 125 mM. Samples were preincubated with 2 µg poly(dIdC) for 15 min on ice before addition of [<sup>32</sup>P]-labelled double stranded oligonucleotide probes (300,000 cpm per sample). The consensus ERE used for gel retardation assays is derived from the *Xenopus vitellogenin A2* gene. Reactions were incubated at 25°C for 15 min then loading buffer (0.1% bromophenol blue, 60% glycerol) was added (1/5 V/V). Complexes were separated by electrophoresis on 5% polyacrylamide gels in 0.25X TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA) and visualized by autoradiography.

### ***Luciferase assays***

Cells were harvested 36 h post-transfection in lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.9; 0.5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol). Luciferase activity was measured in the presence of luciferin with a Fusion Universal Microplate Analyser (PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada) and was normalized for β-galactosidase activity, measured at 420 nm with a Spectramax 190 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Each transfection was carried out in triplicate and repeated at least three times.

### ***Statistical analysis***

Student test were performed on luciferase assay results and statistical significance was set at 5% level ( $p < 0.05$ ).

### ***Immunoblot analyses***

Whole-cell extracts were prepared as for gel shift assays and 50  $\mu$ g of protein in Laemmli buffer were separated by electrophoresis on 7.5% polyacrylamide-SDS gel and transferred onto nitrocellulose membrane. Blots were incubated in blocking solution (PBS 1X, Tween 20 0.2%, BSA 3%) over-night at 4°C and probed with anti-ER $\alpha$  mouse monoclonal antibody B10 (a kind gift from Prof. P. Chambon) at dilution 1:5000. Membranes were then washed and incubated with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and visualized with an ECL detection kit (PerkinElmer Corp.).

### ***Bioinformatic analysis***

*The logos of 76 known EREs (Bourdeau et al. 2008) was generated with Weblogo (Crooks et al. 2004). The logo of DNA binding domain of nuclear hormone receptors were generated with LogoBar (Perez-Bercoff et al. 2006) using sequences from the Pfam database (Finn et al. 2010) <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00105>*

*The Chi-square tests for independence of nucleotide positions in ERE and of amino acids in the DBD of nuclear receptors were done with the “chisq.test” function of the R language (Dessau et al. 2008) <http://www.R-project.org>.*

### ***Modeling***

Modeling was performed using the InsightII/Discover package (version 2000, Accelrys Inc., San Diego, CA) and the X-ray structure of the ER $\alpha$  DBD bound to DNA (Schwabe et al. 1993). Distance measurements between atoms were performed with InsightII tools using a Silicon Graphics O2 computer.

## RESULTS

***Amino acid R211 is crucial for DNA binding by ER $\alpha$ , while amino acids E203, K206, K210 each contribute similarly to the affinity of the interaction.***

The DNA recognition helix formed by the C-terminal part of the first zinc finger of ER $\alpha$  contains four charged amino acids involved in contacts with bases in the target DNA motifs (Fig. 1A). Nucleotides G-5 and G+2 of the DNA motifs interact with residues K206 and R211 of the receptor DNA recognition helix, respectively (Fig. 1A). In addition, K210 interacts with both G-4 and T-3 through direct and water-mediated contacts, while E203 recognizes C+4 and A+3 on the complementary strand (Fig. 1A). Bases at position -/+6 and -/+1 are not directly contacted in the crystal structure.

To evaluate the impact of each ERE bases contacted by ER $\alpha$ 's four amino acids, we transiently transfected ER $\alpha$  wild type receptor in HeLa cells and tested its *in vitro* affinity for response element with each possible bases at position -5, -4, -3 and +2 in both motifs of the palindrome (Fig. 2A). At position -5, contacted by K206, a G or a T can be bound. In the same extent, E203 and K210 can interact with a T or more weakly with a G at position -3, but only with a G in -4. R211 amino acid is able to bind a G in +2 or more weakly an A. Those results partially reflect the position weight matrix for EREs from 76 naturally occurring and experimentally validated EREs (Fig. 2B). According to this group of natural EREs, the base G in position +2 contacted by R211 is the most conserved of the motif. It is also interesting to note that except G+2 and A+3 positions, the observed frequency of all positions are not statistically different from the expected frequency when assuming independence between positions (Fig. 2C and data not shown).

In order to assess the relative contribution of each of the base-contacting amino acids to the affinity of the ER $\alpha$ -ERE interaction, we mutagenized residues E203, K206, K210 and R211 to alanines. The corresponding mutants were transiently transfected in HeLa cells and expression levels of the mutant receptors were found to



be similar by western analysis (Fig. 3A). In gel shift assay using a consensus ERE as a probe, DNA binding was reduced with all mutants. Mutations E203A, K206A, and K210A each reduced the intensities of the DNA-receptor complexes to about 20% (Fig. 3B). In contrast, mutation R211A fully abrogated complex formation. The double mutant E203A-K210A receptor showed an extremely weak or no EREcs binding.

The capacity of the receptor mutants to activate transcription of an ERE-TATA-LUC reporter vector was assessed in a co-transfection assay in HeLa cells. Complexes formed between the ERE and the E203A, K206A, or K210A mutants were as transcriptionally productive as those involving the wild-type receptor, indicating that the reduced affinity observed in gel shift assay is not limiting in the reporter vector assay (Fig. 3C). However, no transcriptional activity was observed with the R211 mutant, confirming the crucial role of R211 in complex formation with the consensus ERE. Double mutants E203A-K210A and K206A-K210A reduced the transactivation capacity of the receptor to 68% and 17%, respectively but did not completely abrogate EREcs binding by the receptor. However, E203A-K206A mutant showed no transcriptional activity. Thus R211 and K206 seem sufficient to maintain ERE-dependent transactivation.

Together, these results indicate that R211 contributes more than any other base-interacting amino acid to DNA binding by nuclear receptors. In this respect, it is of interest to note that the amino acid at position 211 is fully conserved in all nuclear receptors that possess a DNA binding domain (see for instance receptors represented in Fig. 1A).

***Mutagenesis of amino acid R211 abrogates binding to the ERE without yielding recognition of novel response motifs.***

To further investigate the role of R211 in ER $\alpha$ -ERE interaction, we examined *in vitro* binding of the wild type receptor or mutants to elements containing all four possible base pairs at position +2 in both side of the palindromic ERE. All receptors were expressed to similar levels in transiently transfected HeLa cells as assessed by

western analysis (Fig. 4A). Only binding to the element containing a G at position +2, as in the consensus ERE, can be detected with the wild-type receptor, although weak binding to A can also be detected when higher concentrations of receptors are used or using probes where only one side of the palindrome is replaced (Nguyen *et al.* 2007) (Fig. 4B, note that binding to the probe containing a C at position -5 is non-specific, as complexes were formed even with extracts of cells transfected with the empty vector).

Similarly, when the wild-type receptor was co-transfected with reporter vectors containing each one of the four different response elements, transactivation was only observed with the wild-type element, with residual activity with the A+2 element (Fig. 4C), indicating that R211 plays an important role not only in affinity but also in the specificity of the ER $\alpha$ -ERE interaction. In support of this conclusion, compiling 76 naturally-occurring EREs into a position weight matrix (Bourdeau *et al.* 2007) indicates that position +2 of the recognition motif is highly constrained (Fig. 2B). By contrast, the computational model, presented in figure 1B, proposes that the only base able to be bound is a G in position +2 in presence of the wild type receptor containing R211.

We next tested whether replacement of R211 by other amino acids can yield receptor mutants with altered DNA binding specificity for bases at position +2. According to the model, the four bases at +2 can be bound by changing the amino acid at position 211 (Fig. 1B). In this extent, replacement by small amino acids (G, A or V) abrogated binding on the consensus ERE without yielding complex formation on other elements (Fig. 4B). Nevertheless, none of the R211 mutants containing long hydrophobic (L, I or M) nor non-polar (N or Q) nor acidic (E or D) amino acids allowed complex formation on any of the four +2 probes (Fig. 4B). Finally, replacement of R211 by lysine also prevented binding on all four probes (Fig. 4B), indicating that charge conservation is not sufficient to allow binding and that the length of the arginine side chain is likely to be important for its permissive role in complex formation with the DNA helix. These results were confirmed by transactivation assays, in which none of the mutants tested induced transcription with

any of the TATA-ERE-luciferase reporter vectors carrying +2 G, C, T, or A elements (Fig. 4C).

***Small amino acids at position 206 are permissive for interaction with PuNGTCA response motifs.***

To determine whether the specificity of the interaction between amino acid K206 and the base G-5 in the DNA motif can be modified by site-directed mutagenesis, we assessed complex formation by the wild type receptor and a series of mutants at position 206 (mutations of K206 to G, A, S, C, V, I, L, M, N, Q, D, E, R) on response elements containing base replacements at position -5 in both arms of the palindromes. Wild-type and mutant receptors were expressed to similar levels in HeLa cells (Fig. 5A).

The wild type receptor bound preferentially G, but also more weakly T at position -5 in gel shift assays (Fig. 5C; note that binding to the probe containing a C at position -5 is non-specific, as complexes were formed even with extracts of cells transfected with the empty vector). Both G and T elements at position -5 allowed transactivation by the receptor in luciferase assays (Fig. 5D; activity with the reporter vector containing a C at position -5 is ligand-independent and observed also in extracts of cells transfected with the empty vector). However, model chemical rules predicted binding of G, A or T base at position -5 of the ERE with the wild type receptor or the K206R mutant. Despite, replacement of K206 by arginine, a charge-conservative mutation, preserved binding to the element containing a G-5, but not T-5 nor A-5, suggesting that the size of the amino acid side chain is important for DNA binding.

On the other hand, replacement of K206 by small amino acids (A, G, S or C), while reducing the efficiency of complex formation on the consensus response element, was permissive for binding (Fig. 5B and C) and transactivation with elements containing any of the four possible bases, but C with K206C, at position -5 of the response motif (Fig. 5D). Transactivation levels were similar or higher than the wild type receptor. None of these interactions were predicted by the chemical

rules of the model (Fig. 1B). These results suggest that K206 side chain size exert negative effect on the binding of EREs at position -5 by limiting the possible interactions with the bases.

***Replacement of K206 by hydrophobic or acidic amino acids does not lead to expected changes in DNA binding specificity.***

Replacement of K206 by hydrophobic amino acids L or M would be expected to bind preferentially to elements containing C or T, and A for K206M only, at position -5 and I or V mutants would not be expected to interact at all (Fig. 1B). However, no interaction with any of the four probes was observed with any of the mutants K206V, I, L or M (Fig. 5B and data not shown). Moreover, no transactivation was observed with the corresponding reporter vectors, but a residual transactivation with K206V on the T-5 ERE (15% of ER $\alpha$  wild type transactivation with EREcs) (Fig. 5D and data not shown).

Receptor mutants containing polar amino acid Q or N would on the other hand be expected to bind preferentially to elements containing A or C at position -5 and not to create any interaction, respectively (Fig. 1B). On the contrary, mutant K206Q was inactive on all elements in gel shift and transactivation assays. While K206N weakly bound and transactivated T-5 ERE containing reporter vector (Fig. 5B and 5C and data not shown). Finally, mutation to acidic amino acids (D and E) did not yield the expected binding specificity either in gel shift or transactivation assays, since none of them bound any of the 4 possible bases at position -5 (Fig. 5B and data not shown).

Together, these observations indicate that although requirement for a lysine residue at position 206 is less stringent for complex formation than that for an arginine at position 211, it is not possible to predictably generate receptors with altered binding specificity through single changes at these positions.

***R211 and K206 are highly conserved through evolution.***

In order to evaluate the conservation of the four bases contacting amino acids E203, K206, K210 and R211 of ER $\alpha$  DNA recognition helix, a sequence logo of 292 well characterized and putative human nuclear receptors were generated along with 40 *Drosophila melanogaster* and 364 *Caenorhabditis elegans* characterized and putative nuclear receptors (Fig. 6). Amazingly the only amino acid present in all nuclear receptors sequences at position 211 is an R, not only in human but also in *D. melanogaster* and *C. elegans*. In all the 3 species, K210 is in more than 90% of the receptor a positively charged amino acid K or R, the only exception occurs in *D. melanogaster* with 3 receptors presenting a G at this position. In human nuclear receptors, K206 is also highly conserved, 98% of the receptors contain a K at position 206, the last 2% are S amino acids, in TLX or PNR for example (Table 1). In *D. melanogaster* and *C. elegans* amino acid at this position are more various with 10% of S and 2% of A and 45% of A and 6% of S, respectively. The G observed at this position in *D. melanogaster* nuclear receptor correspond to receptor without C in position 202 and 205. In human receptors the amino acid in position 203 is E or D residues in 88% of the case or G or N. Besides, *D. melanogaster* nuclear receptor only present negatively charged E or a D amino acids in 203 position (78 and 22% respectively). In opposition *C. elegans*, 203 residues are in a vast majority R, N or E. Of these receptors, 40% contain positively charged residues K or R while 10% negatively charged residues E or D.

It is interesting to note that positively charged amino acids in position 203 are “associated” with A residue in 206 in 86% of the case and only in 1% of the case with a positively charged residues. In the same extent, 89% of the receptor containing negatively charged residues E or D in 203 present a positively charged amino acids in 206, other receptors contain A or S residues. Finally, the observed amino acid frequencies of the 292 human receptors at position 203 and 206 is statistically different from the expected frequency if these residues were independent ( $X^2$  test p-value = 1e-05, data not shown).

## *DISCUSSION*

Understanding the molecular mechanisms of specific interaction between transcription factors and DNA is a key to comprehend the regulation of gene expression. In that prospect, we tested whether mutation of the amino acids K206 and R211 of ER $\alpha$  DNA recognition helix contacting G-5 and G+2 bases of the consensus ERE, respectively, can lead to the rational design of new DNA binding specificity. R211 and K206 modification alter DNA binding in various ways depending of the amino acid. On the one hand R211 is fundamental for DNA binding, none of the mutants are able to bind DNA contrasting from the DNA recognition code predictions. On the other hand K206 seems to have a dual role on DNA binding. While K206 has a positive impact on DNA binding, it also exerts a strong restriction on the selectivity of the base at the position -5. Also a new specificity, with a weak transcriptional activity, was observed with the K206V mutant binding only T-5.

The highly conserved R211 amino acid is a tight determinant of ER $\alpha$ -ERE binding, as shown by the fact that none of the mutants are able to bind DNA (Fig. 4). Although basic amino acids preferentially bind to G and T, which present only negatively charged groups in the major groove, replacement of G+2 by T in both motifs or even in a single motif was sufficient to abolish ER $\alpha$  binding to DNA (Nguyen *et al.* 2007). Molecular modeling suggested that lack of binding to T at position +2 results from steric hindrance, due to the methyl group of T+2, which prevents productive interaction between the amines of R211 and O4 of T+2 (Nguyen *et al.* 2007). We also observed that none of mutant receptors at position 211 allow binding of ER $\alpha$  to DNA, at levels detectable in gel shift or in transactivation assays, regardless of the base present at position +2. The observation that changing arginine to lysine was sufficient to abrogate binding, and that no other amino acid base combination can yield stable complexes, suggests that R211 is crucial for the affinity of the ER $\alpha$ -ERE complex. Examination of the crystal structure of dimer of ER $\alpha$  DBD with the consensus ERE indicates that the guanidinium functionality of R211

establish hydrogen bonds with G+2 and with the phosphate of T+1. In addition, the terminal part of the side chain of R211 closely packs with both the DNA helix and the recognition helix of the receptor, contributing importantly to the stability of the interaction (Fig. 7). The fragment orbital calculation used by Watanabe *et al.* also emphasize that positively charged amino acids of each ER $\alpha$ -DBD have strong electrostatic interactions with the negatively charged phosphate groups of the DNA at position T/A +/-1 (Watanabe *et al.* 2007). These two binding points would be necessary to produce a stable ER $\alpha$ -ERE complex. Moreover, another computational model that analyse ER $\alpha$  interaction with various ERE sequences highlights R211 very strong interaction with DNA at position T+1 along with an interaction with G+2 (Marabotti *et al.* 2007). Our results combined with other group observations show that R211 side chain contacts with the phosphate group of DNA at T+1 and the base G+2, along with its packing properties with both ER $\alpha$  recognition helix and DNA are essential to create a stable ER $\alpha$ -ERE complex. These complex and multiple properties of R211 might explain the poor performance of the recognition code to predict the effect of its mutation on DNA binding. Finally, our mutation analysis together with the perfect conservation of R211, not only within human nuclear receptors but also in *D. melanogaster* and within the considerably more diverse family of *C. elegans* receptors, indicates that this residue is not only crucial to the mode of DNA binding of estrogen receptor but also for the nuclear receptor family (Fig. 6) (Robinson-Rechavi *et al.* 2005).

This amazing property of R211 on DNA binding wasn't expected, since bio-informatics tools failed to predict it, neither the DNA recognition code (Suzuki *et al.* 1994) nor a more recent program TFmodeller (data not shown) (Contreras-Moreira *et al.* 2007). TFmodeller is a computational model based on DNA-protein interface homology contained in the Protein Data Bank which goal is to predict a putative binding site for any amino acid sequences entered in the program. On the other hand, the DNA recognition code based on transcription factor crystallographic structures takes in account more complex protein-DNA binding particularities. Indeed, it incorporates chemical and stereochemical constraints specific to the position of the DNA recognition helix with respect to the major groove of the DNA (Suzuki *et al.*

1994). Although limitation of the model considering only one base contacting one amino acid made it inadequate for our previous study of the complicated case of ER $\alpha$  E203 and K210 amino acids contacting the same ERE central base pair on both strand of the DNA (Nguyen *et al.* 2007). In the present study, the R211 DNA recognition helix amino acid is engaged in a simple one amino acid-one base interaction with G+2. However, the performance of this model was unexpectedly inaccurate in predicting the total absence of binding of R211 ER $\alpha$  mutants. For instance, six large amino acids at this position (R, K, L, M, E and Q) were supposed to bind various bases at +2 position of the ERE (fig. 1B and 4). In the same extent, both models failed to predict the binding capacity of the ER $\alpha$  K206 mutants. In fact, the DNA recognition code does not consider the contacts made between DNA and this amino acid. As a result, the sole use of chemical rules failed to predict ER $\alpha$  K206 binding capacity of the mutants. In conclusion, even in a simple case of one amino acid contacting one base, the recognition codes have poor performance in predicting the effect of mutations in ER $\alpha$  DNA recognition helix on DNA binding.

One of the possible explanations for the poor performance of computational models in predicting ER $\alpha$ -ERE binding is their difficulty to manage the multiple physic-chemical factors implicated. Ideally, such programs would take in account various kind of interaction as such as hydrogen bonds, electrostatic interactions, hydrophobic effects, etc but also DNA deformation resulting for the receptor binding, etc (Benos *et al.* 2002). Moreover, many bioinformatics models are based on the assumption that each amino acid of the DNA binding helix and base of the response element are independent from one another, but it is untrue in the case of ER $\alpha$  and EREs. Indeed, the observed residue frequencies from known EREs on the one hand and nuclear receptor DBD on the other hand highlight the fact that all the positions are not independent from each other (figure 2B and data not shown). Naturally occurring and experimentally validated EREs in figure 2B showed that position G+2 and A+3 are not independent. Futhermore, DBD's amino acid sequence analysis of 292 well characterized and putative human nuclear receptors showed that residues at position 203 and 206 are not independent (figure 6 and data not shown). Therefore,



nuclear receptors, especially ER $\alpha$ , multiple determinants and their complicated roles in DNA binding make bio-informatical models very difficult to develop because of the necessary simplifications used.

The high conservation of the K206 amino acid through human, drosophilae and nematode's nuclear receptors draw attention to its importance in DNA binding. In addition, natural mutation of the K206 equivalent amino acid in androgen receptor is associated with defect in androgen responsiveness syndrome (Nguyen *et al.* 2001). Our results demonstrate that K206 is less crucial than R211 for binding affinity, since it can be replaced by an arginine or small amino acids without abrogating binding to the consensus response element. Those results correlate with the lower strength of K206 interaction with DNA calculated by FMO or HINTSCORES' method compared to R211 (Marabotti *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2007).

Replacement of K206 by tiny amino acids A, G, S and C induces relaxation of binding specificity of the base at position -5 of the ERE. Those mutants show that, in the absence of steric hindrance, EREs containing any base at -5 position could be bound with a good transcriptional activity, except C-5 for K206C. Furthermore, replacement of K206 by the small residues V or N, instead of tiny ones, is sufficient to impair the specificity relaxation. Therefore, tiny amino acids binding specificity relaxation suggest that K206 act in limiting the possible base bound at position -5 of the ERE. In addition, since ER $\alpha$  mutant reporter gene transactivation is, in some case, higher than the wild type, we can propose that K206 exert a negative effect on ER $\alpha$  DNA binding. ER $\alpha$  *in vitro* binding affinity obtained from gel shift assays does not always linearly relate with ERE dependent transcription of the luciferase reporter gene. Klinge C.M. team already reported this discordance with mutant EREs (Klinge 2001). It can result at least in part from sequence-specific and protein induced alterations in chromatin architecture or cellular amount of transcription factors.

At position 206, the only ER $\alpha$  amino acids capable of binding DNA, in a strong and selective manner, are the negatively charge residues K or R. K206 provides stable complexes with EREs containing G or T at position -5, but prevents binding to A or C. Charge attraction might be implicated since G and T bases both

presents negatively charge groups in the major groove of the DNA helix since A or C present one positively charge group. On the other hand, replacement of K206 by R restricted the specificity at this position, binding only to G-5, likely because of steric hindrance due to the larger side chain of R and the methyl group of T-5, which can not be overcome by charge attraction anymore. Indeed, comparably large or smaller but non-charged amino acids did not show any ERE binding, no matter what the base was in position -5 except from K206N and K206V. The mutant K206N interacts with T-5 and presents a residual binding on G-5. While K206V only presented a weak binding of the T-5 ERE, then harboring a new binding specificity since it lost the binding of the consensus ERE.

Surprisingly, the short size of the negatively charged D residue side chain did not allow interaction with any of the possible EREs, not even those harboring a C or A-5 that present positive charge in the major groove of DNA helix. Molecular modeling of these mutants highlight the fact that amino acid negative charge of the neighboring G-4 may interfere with the binding of EREs. As a consequence, negatively charged amino acids at this position would not be compatible with DNA binding. Accordingly, none the 292 human nuclear receptors enclose a negatively charge amino acid at 206 position, 98% present a K206 and only 2% of the receptors, such as TLX and PNR, have a S residue at this position (Fig. 6 and Table 1). TLX and like its *D. melanogaster* ortholog was observed to bind to a AAGTCA simple motifs (Yu *et al.* 1994), while PNR binding site is unknown. In the same extent, *D. melanogaster* nuclear receptors contain a K in 87% of the case and an S in 10%, through *C. elegans* receptors mainly include A or K amino acids at position 206 and more rarely a S (figure 6). The receptors containing an A or a S in position 206 would be expected from data generated here to bind DNA with a relaxed specificity at position +/- 5, although we cannot exclude that other changes in amino acids elsewhere in the DNA binding helix may restrict this specificity. Finally, of all the nuclear receptors in this species, none of them contain a negatively charged residue at in place of K206 of ER $\alpha$ . Besides, a closer look to the receptors with an S at this position show that the amino acid at position 203 is no longer an E. Human and *D. melanogaster* receptors contain D or N residues, since *C. elegans* presents more

possibilities. These observations suggest interdependency between amino acids present in position 206 and 203, K206 and E203 in ER $\alpha$ . To further support this hypothesis, amino acids charges of residues in position 203 and 206 are always opposed except in 1% of *C. elegans* receptor (four receptors with unknown DNA binding). In human and *D. melanogaster*, amino acids in position 203 are exclusively negatively or non-charged residues. Indeed, theoretical frequencies considering independency of the amino acid pair at position 206 and 203 differs from the observed frequencies in the 292 well characterized and putative human nuclear receptors showing that these two positions are not independent.

Finally, those results point out the importance of the positive charge of K206 to overcome the steric hindrance of the amino acid side chain to bind G-5 (and T-5) EREs in a stable complex, but also its restraining effect on DNA binding specificity. Moreover, the K206V mutant also presents a weak transcriptional but new binding specificity. The possible transcriptionally active binding of EREs containing a T at position -5, could explain in part the binding of this imperfect EREs in the genome as for the RARA or the EFEMP1 gene for example which transcription is under the control of an imperfect EREs GTGTCA-GGGTCA and ATGTCA-AGGACA, respectively ((Laganiere *et al.* 2005)et (Contreras-Moreira *et al.* 2007)).

In conclusion, our results from mutagenesis experiments show that the two amino acids R211 and K206 of ER $\alpha$  are crucial for binding affinity and specificity at position -5 and +2 of the DNA motifs; and that a new specificity can be achieved with only one amino acid modification. While R211 is necessary to ER $\alpha$  DNA binding, it seems like the only amino acids possible at position 206 are positively charged K and R, or small A or S amino acids. Even if K206 and R211 implication in EREcs binding seems simple, computational models were unable to accurately predict DNA motif binding of ER $\alpha$  mutants. Moreover the four amino acids contacting ERE bases and the bases are not independent from each other adding another level of complexity. To further understand DNA binding of nuclear receptors, more systematic approach of *C. elegans* receptors could be used to identify bound motifs and their organization. One can expect that, analogous to C2H2 zinc finger receptors, those studies would

lead to the design of C4 nuclear receptors able to bind a sequence of interest in response to hormonal stimulation.

## ***FIGURES AND LEGENDS***

### ***Table 1***

***DNA recognition helix of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) compared to other nuclear receptors from *H. sapiens*, *C. elegans* and *D. melanogaster*.***

The numbers correspond to the amino acid position in the complete sequence of ER $\alpha$ . Base-interacting residues in ER $\alpha$  and their analogs in other receptors are in bold blue. P-box amino acid positions are circle in blue.

### ***Figure 1***

***Model for the selectivity of steroid receptor/DNA interactions.***

A. Model of the amino acid-base interactions underlying specific recognition of the estrogen response element by ER $\alpha$  (Schwabe *et al.* 1993).

B. Predicted interactions between amino acid replacement of K206 or R211 of the ER $\alpha$  DNA recognition helix and their cognate bases at position -5 or +2, respectively (adapted from (Suzuki *et al.* 1994)).

### ***Figure 2***

***Contribution of ERE bases, implicated in specific interactions with amino acids of ER $\alpha$ , in its binding to DNA.***

A. Gel shift assays were carried out with whole HeLa cell extract transiently transfected with wild type ER $\alpha$  receptor or the same empty vector as a control. Probes corresponded to the consensus ERE (EREcs) or elements with base replacements at position -5, -4, -3 and +2 in both arms of the palindrome. The letters on top of the gel shifts represent the base of the consensus ERE (on top) and the base of the ERE bound (below). The stars represent specific binding, with the wild type receptor (in red) or the mutants (in blue).

B. Sequence logo of 76 naturally occurring and experimentally validated EREs as described in (Bourdeau *et al.* 2007). The more often the base is present in the EREs tested, the bigger it appears on the graphical representation.

C. Table comparing the observed frequency of di-nucleotides at position -3 -2 (or +2 +3) and expected frequency when assuming that these position are independent.

### **Figure 3**

#### ***Contribution of base-interacting amino acids of the DNA recognition helix in ER $\alpha$ binding to the consensus ERE.***

A. Western analysis of expression levels of ER $\alpha$  wild type or mutants, thereof with individual base-contacting residues mutagenized to alanines, in whole cell extracts of transiently transfected HeLa cells.

B. Gel shift assays performed with the same extracts and a probe corresponding to the consensus ERE (EREcs). The letters on top of the gel shifts represent the base of the consensus ERE (on top) and the base of the ERE bound (below). The stars represent specific binding, with the wild type receptor (in red) or the mutants (in blue).

C. Transactivation luciferase assays performed in HeLa cells with the same expression vectors co-transfected with a TATA-LUC reporter vector containing the consensus ERE upstream of the TATA box or with the parental ERE-less reporter vector (noted 0). Cells were co-transfected in presence or in absence of E2 treatment (vehicle is noted 0). Results are expressed as relative luciferase units (RLUs) : percentage of the values obtained for the wild type ER $\alpha$  in presence of E2, and represent the mean  $\pm$ SD of 3 independent values. \*  $p < 0,005$ , versus values from the same transfected cells in absence of E2. \*\*  $p < 0,001$ , versus values from cells transfected with ER $\alpha$  wild type in presence of E2.

**Figure 4*****Integrity of amino acid R211 is crucial for binding to DNA.***

A. Western analysis of the expression levels of wild type ER $\alpha$  and of R211 mutants in whole cell extracts of transiently transfected HeLa cells.

B. Gel shift assays performed with the same extracts as A. on probes containing either the consensus ERE with a G in position +2 (EREcs) or elements with base replacements introduced in both motifs at the same +2 position. The letters on top of the gel shifts represent the base of the consensus ERE (on top) and the base of the ERE bound (below). The stars represent specific binding, with the wild type receptor (in red) or the mutants (in blue).

C. Transactivation assays performed, as in fig. 3, in HeLa cells co-transfected with expression vectors for ER $\alpha$  wild type or R211 ER $\alpha$  mutants and TATA-LUC reporter vectors containing the consensus ERE or position +2 variants. \*  $p < 0,001$ , versus values from the same transfected cells in absence of E2 or versus values from cells transfected with ER $\alpha$  wild type in presence of E2.

**Figure 5*****Long amino acids at position 206 restrict the DNA binding specificity at position -5.***

A. Western analysis of the expression levels of wild type ER $\alpha$  and of K206 mutants in whole cell extracts of transiently transfected HeLa cells.

B. Gel shift assays performed with the same extracts as A. on the consensus ERE probe.

C. Gel shift assays performed with the same extracts as A. on probes containing either the consensus ERE G-5 or elements with base replacements introduced at position -5, in both motifs. The letters on top of the gel shifts represent the base of the consensus ERE (on top) and the base of the ERE bound (below). The stars represent specific binding, with the wild type receptor (in red) or the mutants (in blue).

D. Transactivation assays performed, as in fig. 3, in HeLa cells co-transfected with expression vectors for wild type ER $\alpha$  or K206 mutants with TATA-LUC reporter vectors containing the consensus ERE or position -5 variants. \*  $p < 0,005$ , versus values from the same transfected cells in absence of E2. !  $p < 0,005$ , versus values from cells transfected with ER $\alpha$  wild type in presence of E2.

### **Figure 6**

***Sequence logo of nuclear receptor DBDs of *H. sapiens*, *D. melanogaster* and *C. elegans*.***

Sequence logo generated from the alignment of 292, 40 or 364 DBDs of well characterized and putative nuclear receptors of *H. sapiens* (A.), *D. melanogaster* (B.) and *C. elegans* (C.), respectively. Amino acids sequences in the red boxes correspond to the alignment of the DNA recognition helix of ER $\alpha$ . Residues in red boxes are the analogs amino acids of E203, K206, K210 and R211.

### **Figure 7**

***The side chain of R211 provides stabilizing packing interactions with both the DNA helix and the recognition helix in the DBD of ER $\alpha$ .***

A. Hydrogen bonding interactions between the guanidinium group of R211 and the N7 atom of G+2 and the phosphate of T+1. The side chain of R211 is shown in skeletal representation whereas other atoms of interest are in CPK representation.

B. CPK representation of the packing interactions between the guanidinium group of R211 and the niche formed by the bases of the response motif and the peptide backbone of the DNA recognition helix. Note that because of the unique length of the R side chain, no other amino acid is capable of reaching this niche.

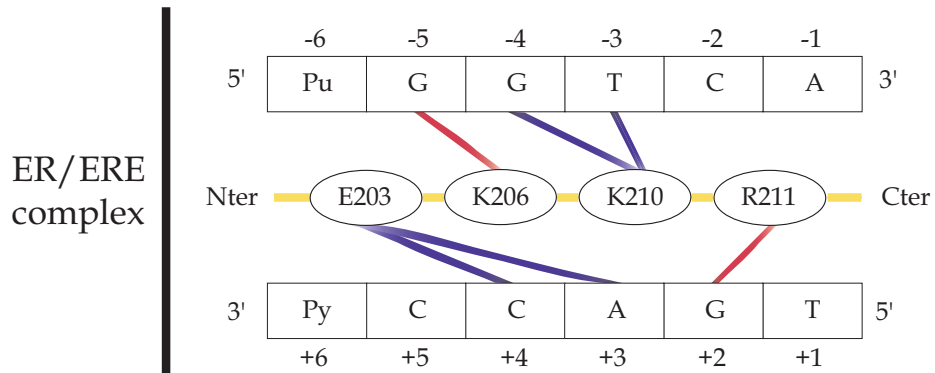


# Table 1

DNA recognition helix																
# aa	ERa	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214		
Hs	ERa	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Ala	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln	PuGGTCA	IR3
Hs	RXRa	Cys	Glu	Gly	Cys	Lys	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Thr	Val	Arg	AGGTCA	DR1
Hs	GR	Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Val	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Val	Glu	PuGAACA	IR3
Hs	AR	Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Val	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	PuGAACA	IR3
Hs	TLX	Cys	Asp	Gly	Cys	Ser	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Arg	AAGTCA	NR
Ce	NHR67	Cys	Asp	Gly	Cys	Ala	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Arg	AAGTCA	
Dm	TII	Cys	Asp	Gly	Cys	Ala	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Arg	AAGTCA	
Hs	PNR	Cys	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Val	Ile	Arg	AAGTCA	DR1
Ce	FAX1	Cys	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Val	Arg	ANGTCA	DR1
Dm	NR2E3	Cys	Asn	Gly	Cys	Ser	Gly	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Val	Arg		

# Figure 1

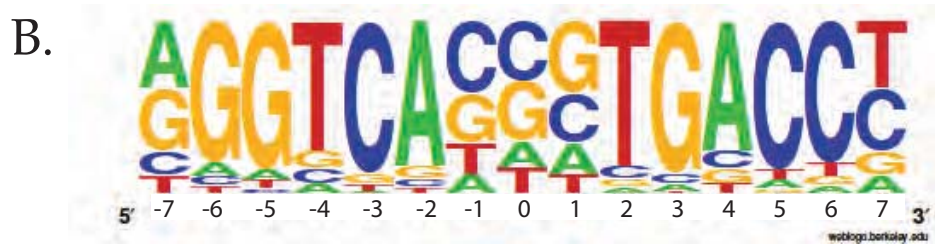
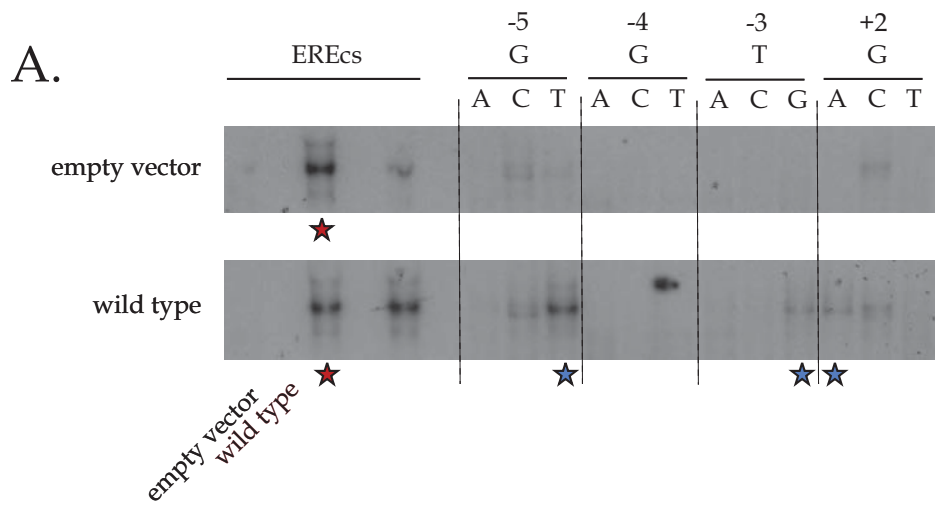
A.



B.

	<b>Lys: K206</b> <b>G-5</b>	<b>Arg: R211</b> <b>G+2</b>
A	Asn, Ap, Gln, Glu	Gln, Glu
T	Val, Ile, Leu, Met	Leu, Met
<b>G</b>	His, Arg, <b>Lys</b>	<b>Arg</b> , Lys
C	Asp, Glu, Leu, Met, Ile	Glu, Leu, Met

# Figure 2



Frequency Matrix:

	-6	-5	-4	-3	-2	-1		+1	+2	+3	+4	+5	+6	
A	0.39	0.08	0.06	0.06	0.01	0.84		0.04	0.05	0.75	0.05	0.05	0.11	A
C	0.14	0.05	0.03	0.09	0.88	0.05		0.07	0.06	0.11	0.86	0.82	0.36	C
G	0.36	0.82	0.86	0.11	0.06	0.07		0.05	0.88	0.09	0.03	0.05	0.14	G
T	0.11	0.05	0.05	0.75	0.05	0.04		0.84	0.01	0.06	0.06	0.08	0.39	T

C.

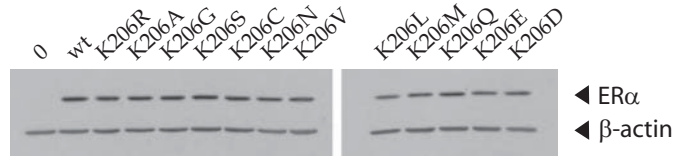
dinucleotides	position -3 -2 or +2 +3		p-value X <sup>2</sup> test
	observed	expected (assuming independence)	
AA	0.000	0.001	0.0097
AC	0.046	0.052	
AG	0.013	0.004	
AT	0.000	0.003	
CA	0.013	0.001	
CC	0.059	0.075	
CG	0.000	0.005	
CT	0.013	0.004	
GA	0.000	0.001	
GC	0.072	0.093	
GG	0.013	0.006	
GT	0.020	0.005	
TA	0.000	0.010	
<b>TC</b>	0.704	0.661	
TG	0.033	0.044	
TT	0.013	0.035	



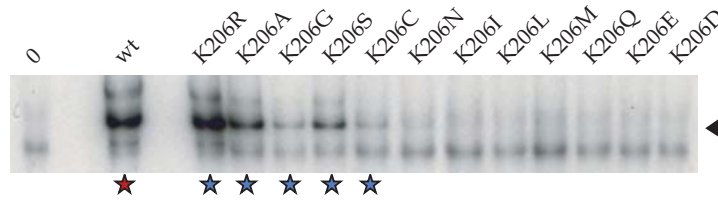


# Figure 5

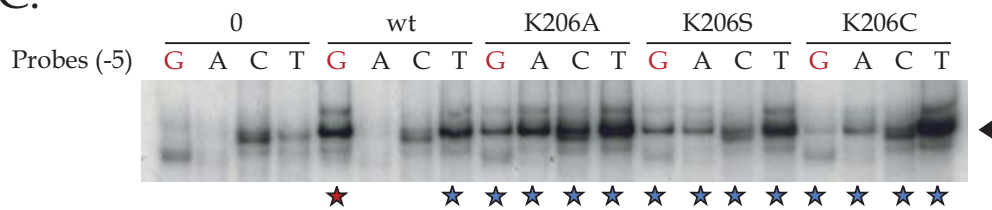
A.



B.



C.



D.

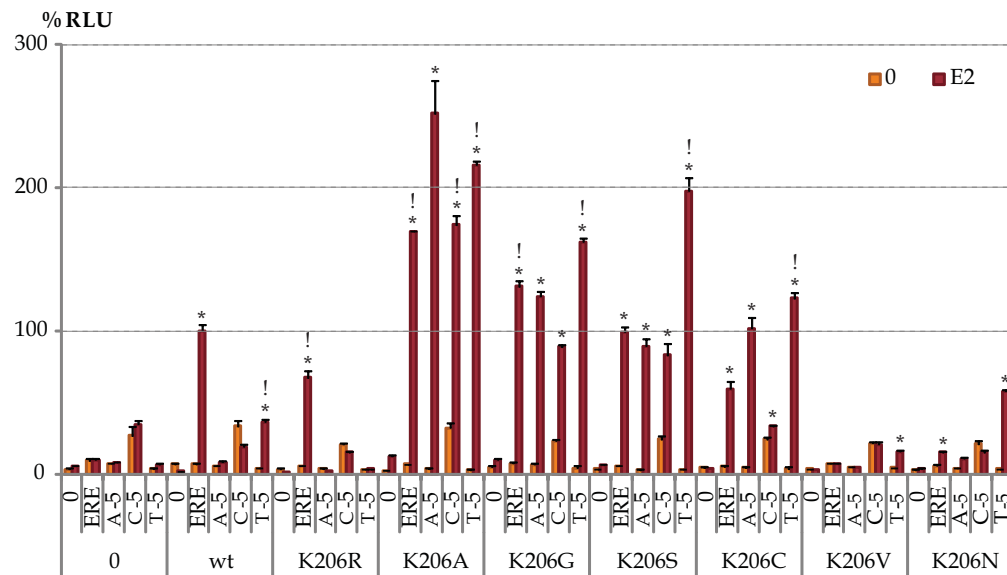
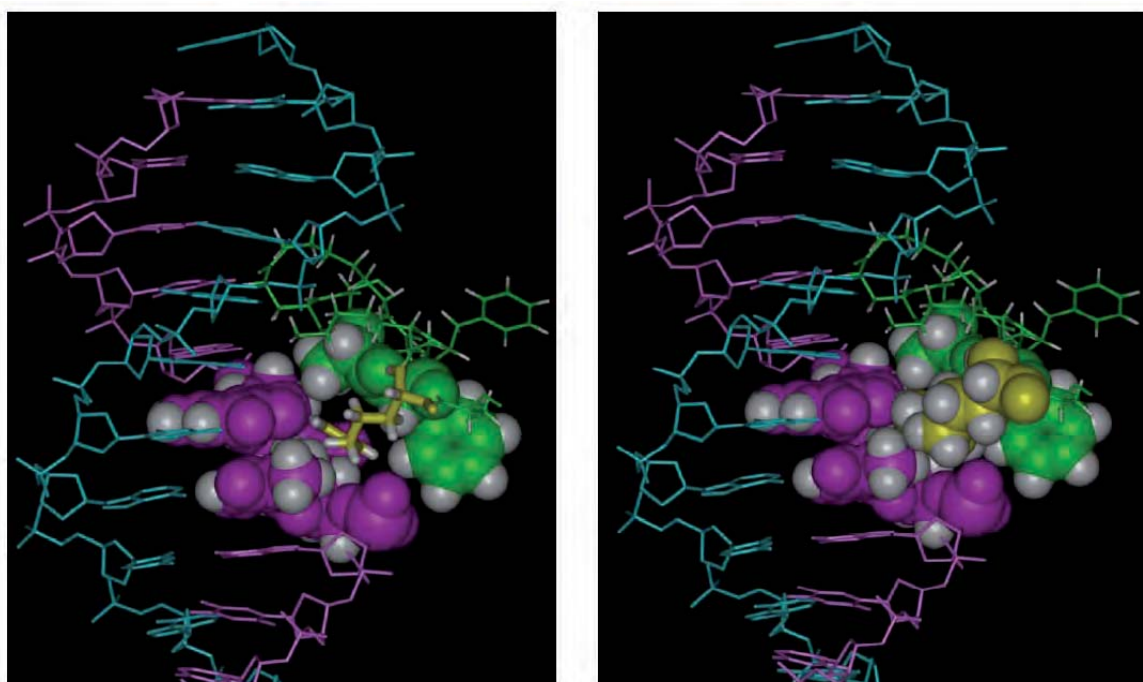




Figure 7





## REFERENCES

- Antebi, A. (2006). "Nuclear hormone receptors in *C. elegans*." *WormBook*: 1-13.
- Baumann, H., et al. (1993). "Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain." *Biochemistry* **32**(49): 13463-13471.
- Beato, M., et al. (2000). "Steroid hormone receptors: an update." *Hum Reprod Update* **6**(3): 225-236.
- Benos, P. V., et al. (2002). "Additivity in protein-DNA interactions: how good an approximation is it?" *Nucleic Acids Res* **30**(20): 4442-4451.
- Blancafort, P., et al. (2005). "Genetic reprogramming of tumor cells by zinc finger transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(33): 11716-11721.
- Blancafort, P., et al. (2004). "Designing transcription factor architectures for drug discovery." *Mol Pharmacol* **66**(6): 1361-1371.
- Bourdeau, V., et al. (2007). "Mechanisms of primary and secondary regulation of estrogen target gene regulation in breast cancer cells." *Nucleic Acid Res.*
- Bourdeau, V., et al. (2008). "Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells." *Nucleic Acids Res* **36**(1): 76-93.
- Bourdeau, V., et al. (2004). "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse." *Mol Endocrinol* **18**(6): 1411-1427.
- Boussif, O., et al. (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7297-7301.
- Carroll, J. S., et al. (2005). "Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1." *Cell* **122**(1): 33-43.
- Choo, Y., et al. (1994). "Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23): 11163-11167.
- Clarke, N. D., et al. (1998). "Zinc fingers in *Caenorhabditis elegans*: finding families and probing pathways." *Science* **282**(5396): 2018-2022.
- Contreras-Moreira, B., et al. (2007). "TFmodeller: comparative modelling of protein-DNA complexes." *Bioinformatics* **23**(13): 1694-1696.
- Crooks, G. E., et al. (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." *Genome Res* **14**(6): 1188-1190.
- Dana, S. L., et al. (1994). "Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells." *Mol Endocrinol* **8**(9): 1193-1207.

- Danielsen, M., et al. (1989). "Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor." *Cell* **57**: 1131-1138.
- Deschenes, J., et al. (2007). "Regulation of GREB1 transcription by estrogen receptor alpha through a multipartite enhancer spread over 20 kb of upstream flanking sequences." *Journal of Biological Chemistry* **282**(24): 17335-17339.
- Dessau, R. B., et al. (2008). "[R]-project for statistical computing]." *Ugeskr Laeger* **170**(5): 328-330.
- Driscoll, M. D., et al. (1998). "Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements." *J Biol Chem* **273**(45): 29321-29330.
- Finn, R. D., et al. (2010). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D211-222.
- Gewirth, D. T., et al. (1995). "The basis for half-site specificity explored through a non-cognate steroid receptor-DNA complex." *Nat Struct Biol* **2**(5): 386-394.
- Glass, C. K. (1994). "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers." *Endocrine Rev* **15**: 391-407.
- Green, S., et al. (1988). "Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation." *Trends Genet* **4**(11): 309-314.
- Gruber, C. J., et al. (2004). "Anatomy of the estrogen response element." *Trends Endocrinol Metab* **15**(2): 73-78.
- Jamieson, A. C., et al. (1994). "In vitro selection of zinc fingers with altered DNA-binding specificity." *Biochemistry* **33**(19): 5689-5695.
- Khorasanizadeh, S., et al. (2001). "Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements." *Trends Biochem Sci* **26**(6): 384-390.
- Klein-Hitpass, L., et al. (1988). "A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor." *Nucleic Acids Res* **16**(2): 647-663.
- Klinge, C. M. (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." *Nucleic Acids Res* **29**(14): 2905-2919.
- Klock, G., et al. (1987). "Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct." *Nature* **329**: 734-736.
- Kulakosky, P. C., et al. (2002). "Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 137-152.
- Laganriere, J., et al. (2005). "Functional genomics identifies a mechanism for estrogen activation of the retinoic acid receptor alpha1 gene in breast cancer cells." *Mol Endocrinol* **19**(6): 1584-1592.
- Laudet, V., et al. (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." *EMBO J* **11**(3): 1003-1013.

- Lin, C. Y., et al. (2007). "Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites." *PLoS Genet* **3**(6): e87.
- Mader, S., et al. (1993). "Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain." *Nucleic Acids Res* **21**(5): 1125-1132.
- Mader, S., et al. (1989). "Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element." *Nature* **338**(6212): 271-274.
- Mandell, J. G., et al. (2006). "Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases." *Nucleic Acids Res* **34**(Web Server issue): W516-523.
- Marabotti, A., et al. (2007). "New computational strategy to analyze the interactions of ERalpha and ERbeta with different ERE sequences." *J Comput Chem* **28**(6): 1031-1041.
- Martinez, E., et al. (1989). "Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity." *EMBO J* **8**(12): 3781-3791.
- Nguyen, D., et al. (2007). "Rational design of an estrogen receptor mutant with altered DNA-binding specificity." *Nucleic Acids Res.*
- Nguyen, D., et al. (2001). "A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome." *Mol Endocrinol* **15**(10): 1790-1802.
- Nordeen, S. K., et al. (1990). "Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element." *Mol Endocrinol* **4**: 1866-1873.
- O'Lone, R., et al. (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." *Mol Endocrinol* **18**(8): 1859-1875.
- Papworth, M., et al. (2006). "Designer zinc-finger proteins and their applications." *Gene* **366**(1): 27-38.
- Perez-Bercoff, A., et al. (2006). "LogoBar: bar graph visualization of protein logos with gaps." *Bioinformatics* **22**(1): 112-114.
- Rastinejad, F., et al. (1995). "Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats." *Nature* **375**: 203-211.
- Rebar, E. J., et al. (1994). "Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities." *Science* **263**(5147): 671-673.
- Robinson-Rechavi, M., et al. (2003). "The nuclear receptor superfamily." *J Cell Sci* **116**(Pt 4): 585-586.
- Robinson-Rechavi, M., et al. (2005). "Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes." *J Mol Evol* **60**(5): 577-586.
- Schwabe, J. W., et al. (1993). "The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements." *Cell* **75**(3): 567-578.

- Sera, T., et al. (2002). "Rational design of artificial zinc-finger proteins using a nondegenerate recognition code table." *Biochemistry* **41**(22): 7074-7081.
- Suzuki, M., et al. (1994). "DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26): 12357-12361.
- Umesono, K., et al. (1989). "Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors." *Cell* **57**: 1139-1146.
- Urnov, F. D., et al. (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." *Nature* **435**(7042): 646-651.
- Watanabe, T., et al. (2007). "DNA and estrogen receptor interaction revealed by fragment molecular orbital calculations." *J Phys Chem B* **111**(32): 9621-9627.
- Ylikomi, T., et al. (1998). "Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**(6): 437-466.
- Yu, R. T., et al. (1994). "Relationship between *Drosophila* gap gene *tailless* and a vertebrate nuclear receptor *Tlx*." *Nature* **370**(6488): 375-379.
- Zilliagus, J., et al. (1992). "Determinants for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **267**(35): 24941-24947.

**ARTICLE 3**



## Synergistic inhibition of ER $\alpha$ -positive breast cancer cell proliferation by ICI and SAHA through their capacity to mimic the impact of high dose of SAHA on the transcription of primary E2-target genes

*Virginie N. Dupont, David Laperrière, Martine Bail, Slim Fourati, and Sylvie Mader*

### CONTRIBUTION DES AUTEURS :

---

- *Virginie N. Dupont* a planifié et conçu toutes les expériences\* de l'étude sous la supervision du Dr. *Sylvie Mader*. Elle a également réalisé et analysé ces dernières\*\*. Écriture du manuscrit et conception de toutes les figures.

\* à l'exception de la conception et de la réalisation des puces à ADN.

\*\* l'analyse des puces à ADN à été accomplie conjointement avec *David Laperrière*.

- *David Laperrière* a analysé des puces à ADN et participé à la réalisation des figures 5, 6 et supplémentaire 3.
- *Martine Bail* a participé à la conception et à la préparation des ARN totaux pour les puces à ADN. Elle a également participé à leur analyse.
- *Slim Fourati* a mis au point un programme d'analyse de la synergie en se basant sur l'article : Chou TC and Talalay P, Adv Enzyme Regul. 1984.





# ARTICLE 3

**SYNERGISTIC INHIBITION OF ER $\alpha$ -POSITIVE BREAST CANCER CELL PROLIFERATION  
BY ICI AND SAHA THROUGH THEIR CAPACITY TO MIMIC THE IMPACT OF HIGH  
DOSE OF SAHA ON THE TRANSCRIPTION OF PRIMARY E2-TARGET GENES**

Virginie N. Dupont, David Laperrière, Martine Bail, Slim Fourati, and Sylvie Mader\*

[Redacted]

\* To whom correspondance should be addressed at: [Redacted]

[Redacted]

**ABSTRACT**

Despite the progress in breast cancer therapy, it is still the second cause of death by cancer in the western world. The estrogen receptor ( $ER\alpha$ ) is expressed in more than 70% of breast tumors, which proliferate in response to E2 stimulation. In these cases, the anti-estrogen ICI provokes  $ER\alpha$  degradation and  $ER\alpha$ -positive breast cancer growth arrest. Moreover, the new class of anti-tumoral drugs, HDACi, such as SAHA, has been shown to modulate the estrogen-mediated signal transduction pathway and to have promising properties in association with other anti-neoplastic drugs. In this context, our goal was to determine the impact of the combined treatment ICI and SAHA on breast cancer cell proliferation and its mechanism. To this end, breast cancer cell growth curves were realized in presence of escalating doses of ICI and SAHA, as single agents or in combination. The combination index values demonstrate the strong synergy of ICI and SAHA to inhibit MCF-7 and ZR-75 cell proliferation, but also the absence of ICI effect in MDA-MB-231 or SK-BR3 cells with or without SAHA. The synergy occurs through the cooperation of ICI and SAHA to reduce  $ER\alpha$  protein levels, and block the cell cycle progression of  $ER\alpha$ -positive, but not  $ER\alpha$ -negative, breast cancer cells through the transcriptional regulation of E2-target genes implicated in the cell cycle. Actually, high doses of HDACis completely and rapidly mask E2-transcriptional signaling in MCF-7 cells. At short time, they probably act via several pathways, including non-histone protein acetylation; and after 24hr of treatment, their impact result from the depletion of  $ER\alpha$ . Moreover, ICI and SAHA co-treatment differently regulates primary and secondary E2-target gene transcription. Primary E2-target genes, containing EREs, show the same transcriptional regulation in presence of high doses of SAHA as with the co-treatment, using clinically feasible doses of ICI and SAHA. ERE-dependent luciferase reporter gene expression demonstrates that the HDACi-induced loss of  $ER\alpha$  inhibits its own HDACi-induced up-regulation of ERE-dependent gene transcription. Then the fact that ICI mimics the impact of high doses of SAHA through  $ER\alpha$  degradation, allows it to potentiate the repressional effect of SAHA on ERE-dependant transcription. Finally, the synergy of ICI and SAHA might increase the potency of breast cancer therapy.

## INTRODUCTION

Despite prevention and treatment advances, breast cancer is still the second cause of death by cancer in the western world (Comité directeur de la Société canadienne du cancer, 2010). For many years, estrogens (E2) and their receptors have been known to play a major role in the development and progression of breast cancer. In response to E2 stimulation, the estrogen receptor alpha ER $\alpha$  - which is a transcription factor - binds DNA as an homodimer, and induces E2-target gene transcription. ER $\alpha$  actually is expressed in more than 70% of breast tumors: ER $\alpha$ -positive tumors; and it induces, under estrogen stimulation, mammary epithelial cell proliferation (Simpson *et al.*, 2000). Considering its signaling properties, estrogen pathway is a good target for breast anti-tumoral therapy. Drugs targeting estrogen pathway can act on two levels to block estrogen-mediated cell proliferation. On the one hand, E2 production is inhibited by aromatase inhibitors, such as Anastrozole (Arimidex); on the other hand, ER $\alpha$  activity is targeted by anti-estrogens. Anti-estrogens are small lipophilic molecules that bind to ER $\alpha$  and exert antagonist activity. For more than 30 years, the partial hormonal Tamoxifen (Nolvadex) is the gold standard for anti-estrogen therapy; and it is used as an adjuvant treatment of breast cancer in pre-menopausal women. However, its agonist effects, beneficial to maintain bone density are also potentially harmful with an increased risk of endometrial cancer (Anzai *et al.*, 1989; Fisher *et al.*, 1994; van Leeuwen *et al.*, 1994). A second generation of anti-estrogens, full anti-estrogens as ICI 182.780 (Faslodex, Fulvestrant), do not present any agonist effect neither in bone nor in uterus (Sibonga *et al.*, 1998; Wakeling *et al.*, 1991). They are used as a second line of treatment for advanced breast cancer of post-menopausal women. Interestingly, ICI does not present any cross-resistance with other anti-estrogen drugs, which allow the use of several anti-estrogens in sequential treatment (Howell *et al.*, 1995). Moreover, ICI is twice as potent as Tamoxifen to inhibit the proliferation of the ER $\alpha$ -positive breast cancer cell line MCF-7 (Wakeling *et al.*, 1991). In a mechanistic point of view, ICI

blocks both transactivation functions of the estrogen receptor  $\alpha$  (AF-1 and AF-2), and impairs ER $\alpha$  binding to DNA; whereas, tamoxifen allows ER $\alpha$  binding to DNA and blocks only AF-2 transactivation function. These differences explain the more drastic impact of ICI on ER $\alpha$ -positive cells and the absence of agonist effect (Wakeling *et al.*, 1991). Besides, ICI induces ER $\alpha$  26S-dependant degradation via its dimerization destabilization and a fasten polyubiquitination, but has no impact on ER $\alpha$  mRNA expression (Dauvois *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 1995; Parker, 1993; Wakeling, 1995). Even with the rise of anti-estrogens, which greatly improved the treatment of ER $\alpha$ -positive breast cancers, progress still needs to be made. Association of anti-estrogens with other anti-cancer agents may improve breast cancer outcome and patient life quality. A few studies reported association of Tamoxifen with other anti-tumoral drugs (such as retinoic acid or 5-fluorouracil), but those association did not pass the clinical evaluation (Anzano *et al.*, 1994; Benz *et al.*, 1983).

Recently, a new class of anti-neoplastic agents for the treatment of both solid and hematological tumors has emerged: histone deacetylases inhibitors (HDACis) (Martin *et al.*, 2005). Histone deacetylase activity is balanced by histone acetylase activity, and together they control the acetylation state of histones. Acetylation of histone tails, which in turns controls the strength of histone-DNA binding and then the condensation level of the chromatin. Accordingly, in the presence of HDACis, histone acetylation was expected to increase, leading to a decrease in the compaction state of the chromatin, thus facilitating the binding of transcription factors and leading to gene transcription. Surprisingly, HDACis does not induce global gene expression activation; instead, they affect a small set of specific genes (between 2 and 10% of the whole genome, depending on the cell type) and have either a transcriptional or a repressional effect (Glaser *et al.*, 2003; Johnstone *et al.*, 2003; Mitsiades *et al.*, 2004). This is probably due to their effect, not only on histone acetylation, but also on a broad spectrum of non-histone proteins - such as transcription factors, chromatin associated proteins and cargo or structural proteins - whom activities are sensitive to acetylation (Grewal *et al.*, 2003). This multitude of targets allows HDACis to interfere with almost all cellular pathways: cell cycle, apoptosis, angiogenesis, differentiation, cellular mobility, aggresome formation and

immune response. To this date, the only approved HDACi in clinic is SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat, Zolinza®). SAHA has been approved by the FDA for the treatment of cutaneous T cell lymphoma in 2006 (Mann *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2007); and is currently implicated in many clinical trials, alone or in combination, for the treatment of both hematological and solid malignancies (Batty *et al.*, 2009). The anti-tumoral activity of SAHA, or other HDACis such as TSA (Trichostatin A), VPA (valproic acid) or SB (sodium butyrate), have been demonstrated in several experimental models of cancer. However, the mechanism of cytotoxicity implicated is not clearly understood yet. It is interesting to note that, while SAHA blocks cancer cell proliferation both *in vitro* and *in vivo*, it has little or no toxicity to normal cells (Duvic *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2003). In rodents models of hematological malignancies or solid tumors -including breast cancer- SAHA is selectively toxic to transformed cells, in which it induces cell death, but leaves normal cells growth-inhibited but viable (Marks, 2007).

In the context of breast cancer, HDACis affect both ER $\alpha$ -positive and ER $\alpha$ -negative breast cancer cell proliferation. In the ER $\alpha$ -negative breast cancer cell line MDA-MB-231, TSA reduces cell growth, but also restores the response to tamoxifen treatment (via an increase of ER $\beta$  but not ER $\alpha$  expression) (Fan *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2004). Furthermore, SAHA represses cell proliferation and induces low apoptosis in ER $\alpha$ -positive MCF-7 cells (Munster *et al.*, 2001). Besides, HDACis influence E2 signaling pathway at several levels. Treatment of ER $\alpha$ -positive cells by various HDACis, such as TSA, SB, VPA or SAHA, inhibits E2-target gene transactivation and ER $\alpha$  gene transcription via direct and indirect pathways (Alao *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005). SAHA also promotes ER $\alpha$  proteasome degradation (Fiskus *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008). Moreover, HDACis do not only reduce the expression of ER $\alpha$  in breast cancer cells at mRNA and protein levels, they also influence ER $\alpha$  acetylation state, which has been found to regulate estrogen-mediated signal transduction pathway. The impact of ER $\alpha$  lysines' acetylation is not clear yet, however results showing that acetylation of ER $\alpha$  modulate its transcriptional

activation, its ligand sensitivity or its stability has been published (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001).

Even if clinical trials with SAHA alone tend to show that its anti-tumor activity is limited in solid tumors including breast cancer (Blumenschein *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008; Modesitt *et al.*, 2008; Vansteenkiste *et al.*, 2008), its association with various anti-neoplastic therapies (biological, cytotoxic or hormonal) demonstrates promising preliminary results (Health, 2010; Marchion *et al.*, 2007) ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). For example, a phase II clinical trial implicated the treatment of patients with SAHA and tamoxifen shows 21% of response and 33% of stabilization, compared to only 10% of response to tamoxifen alone and no response to SAHA as a single agent (in process in (Thomas *et al.*, 2009)). The association of HDACis and Tamoxifen that restores Tamoxifen sensitivity in tamoxifen-insensitive cells or that reverts resistance to tamoxifen in breast cancer cells, is widely referenced in the literature on HDACi impact on breast cancer cells. However, articles referring to the association of anti-estrogens and HDACis in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells are rare.

Estrogen-mediated signal transduction pathway impact on ER $\alpha$ -positive breast cancer cells proliferation made ER $\alpha$  a target of choice for breast cancer treatment. Already targeted by ICI, which induce ER $\alpha$  immobilization and degradation by a HDAC-independent mechanism; ER $\alpha$  is also modulated by SAHA, mostly through its depletion at transcriptional and protein levels. The selective toxicity of SAHA for transformed cells, as opposed to normal cells, made of SAHA a drug of choice for the combined treatment with anti-estrogens. In addition, the potentiation of Tamoxifen impact on the proliferation of breast cancer cells by SAHA (Fan *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2004), and the fact that the capacity of full anti-estrogens to repress ER $\alpha$  activity does not rely on HDACs enzymatic activities (Margueron *et al.*, 2004), hint that that SAHA and ICI can cooperate to block breast cancer cell proliferation. Administration of the two drugs simultaneously should allow the use of lower doses, in order to limit the side effects of the drugs without sacrificing improved outcomes for breast cancer patients.

In this article, we demonstrate that ICI and SAHA act synergically to repress ER $\alpha$ -positive - but not ER $\alpha$ -negative - breast cancer cell proliferation, at least in part, through ER $\alpha$  depletion and E2-target gene transcription inhibition. In addition, we demonstrate that SAHA has a dual effect on ERE-dependant transcription: on the one hand, SAHA increases ERE-dependent transcription, while on the other hand, it depletes ER $\alpha$  from the cells, leading to the repression of its own effect on ERE-dependent transcription. This effect explains the potentiation of SAHA effect by ICI on primary E2-target gene transcription. Finally, our results indicate the potential benefice of treating ER $\alpha$ -positive breast cancer patients with the combined treatment ICI and SAHA.

## ***MATERIAL AND METHODS***

### ***Cell culture***

ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7 were maintained in  $\alpha$ -minimal Eagle's medium (Wisent, St-Bruno, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, Oakville, Canada). The ER $\alpha$ -positive breast cancer cells ZR-75-1 and ER $\alpha$ -negative SK-BR-3 were maintained in DMEM (Wisent) supplemented with 10% FBS. ER $\alpha$ -negative MDA-MB-231 and HeLa cells were maintained in DMEM (Wisent) supplemented with 5% FBS. All mediums were supplemented with 1% penicillin/streptomycin (Wisent). Cells were maintained in their respective media until near confluence. Two to three days before experiments, cells were switched to phenol red-free DMEM containing 5% charcoal-stripped FBS (FBS-T), 1% sodium pyruvate (Wisent), 1% L-glutamine (Wisent) and 1% penicillin/streptomycin (Wisent).

### ***Compounds and plasmids***

17 $\beta$ -Estradiol (E2) was purchased from Sigma-Aldrich and ICI182.780 (ICI or faslodex) from Tocris Cookson Inc. (Ellisville, USA). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA or Zolanza) was acquired from USBiological (Swampscott, USA) and trichostatin A (TSA) was obtained from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan).

The plasmid pSG5-hER $\alpha$  was a kind gift from Prof. Pierre Chambon (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France). The reporter vector ERE3-TATA-Luc has been described previously (Barsalou *et al.*, 2002).



### ***Growth assays***

For the MTS assay, cells were seeded to low density (2000 cells/well) in 96-wells plates in phenol red-free DMEM containing 5% FBS-T. They were treated, every 2 or 3 days, with vehicle (0.1% ethanol) or E2 (10nM) and exposed to serial dilutions of ICI182.780 and SAHA for 3 to 9 days. ICI and SAHA were administered individually or simultaneously at constant ratios of doses, 1:1, 1:2, 2:1 or 1:3. The number of viable cells was estimated by the “CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay” (Promega, Madison, USA) as indicated by the manufacturer. This colorimetric assay is based on the bioreduction of the tetrazolium (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt) into a formazan dye by metabolically active cells. Following the appropriate exposure to drugs, 5µl of CellTiter 96® were added to each well and incubated for 2hr at 37°C. Absorbance at 490nm was measured using a Spectramax 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Results were analyzed using Prism software (GraphPad). The EC50 were calculated using CalcuSyn 2.0 software (Biosoft). Triplicate data points were used for each concentration and each experiment was repeated at least 3 times. Student t-test were used for the statistical analysis of the results.

In order to determine the synergistic, additive or antagonism effect of the drug combination, Chou and Talalay combination index method (Chou *et al.*, 1984) was used through CalcuSyn 2.0 software. Both the potency (median doses EC50) and the slope of the dose-effect curves were used to calculate the combination index values (CI). CI values allow the discrimination of synergy from additivity or antagonism, respectively  $CI < 1$ ,  $CI = 1$  and  $CI > 1$ .

### ***Cell cycle analysis***

Cells were seeded in 15cm plates in phenol red-free DMEM 5% FBS-T and exposed to ICI 100nM and/or SAHA 300nM in presence of E2 10nM or vehicle 0,1% for 24h or 48h. Cell cycle phase distribution was estimated from cell nuclei staining with propidium iodide (Sigma-Aldrich). Cells were trypsinized, washed twice in cold

PBS-EDTA 8mM and fixed in ethanol 70%. Cells were stored at 4°C at least 1 week until the assay. Cell staining with propidium iodide 50µg/ml was conducted at the same time as RNA digestion by RNase A 100µg/ml (Roche) for 15 minutes at room temperature, and then 1hr at 4°C. Data acquisition was performed on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences) and analysed using ModFit LT 3.2 flow cytometry modeling software (Verity Software House). A typical experiment is shown.

### ***Reporter assays***

ERE-dependant transcription was estimated from luciferase reporter assays. MCF-7 cells were seeded (125000 cells/well) in 12 well plates in phenol red-free DMEM 5% FBS-T, transfected and exposed to serial dilutions of ICI182.780 and SAHA in presence of E2 10nM or vehicle 0.1% for 24hr. Cells were transfected in triplicates for each treatment using the PEI method with 2µg pCMV-βGal and 2µg TATA-ERE3-Luc reporter vector containing 3 copies of the ERα consensus palindromic response element. In the case of ERα over-expression, 100ng of ERα expression vector pSG5-hERα or the corresponding empty vector pSG5 was added. DNA mixes were completed to 15µg with carrier salmon sperm DNA (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Canada). 24hr post-transfection, cells were washed twice in PBS and harvested in a lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.9; 0,5% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol). Luciferase activity was measured in the presence of luciferin with a Fusion Universal Microplate Analyser (PerkinElmer, Woodbridge, Canada) and was normalized for β-galactosidase activity, measured at 420 nm with a Spectramax 190 plate reader (Molecular Devices). Each transfection was performed in triplicates and repeated at least three times. Student t-tests were applied to the data for statistical analysis.

### ***Immunoblot analysis***

ER $\alpha$  protein expression levels were estimated by western blot experiments. Cells were exposed to ICI 100nM and/or SAHA 300nM or TSA 300nM or vehicle 0.1% for 1 to 48hr in presence of E2 10nM or vehicle 0.1% (as indicated in the figure legends). Cells were washed twice and harvested in PBS. Whole-cell extracts were prepared by three freeze-thaw cycles in high salt buffer (HSB, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0,1 mM EDTA, pH 8.0, 400 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM dithiothreitol; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitors) as previously described (Nguyen *et al.*, 2001). Proteins in Laemmli buffer were separated by electrophoresis on 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated in blocking solution (PBS 1X, Tween 20 0,2%, BSA 3%) over-night at 4°C and probed with anti-ER $\alpha$  mouse monoclonal antibody B10 (a kind gift from Prof. P. Chambon) at dilution 1:5000 or anti-acetylated-H4 rabbit monoclonal antibody 1:5000 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA) or anti- $\beta$ -actin 1:10000 (AC-15, Sigma Diagnostics). Membranes were then washed and incubated with a horseradish peroxidase-coupled secondary antibody and visualized with enhanced chemiluminescence as recommended by the manufacturer (PerkinElmer Corp., Boston, USA). A typical experiment from triplicates is shown.

### ***RNA extraction and RT-PCR***

Cells were treated in parallel for protein extraction and RNA extraction. Total RNA was extracted using TRI-reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions and quantified by UV absorption with a Spectramax 190 plate reader (Molecular Devices). cDNAs were generated using 2 $\mu$ g of RNA and the RevertAid H minus direct strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas; Burlington, Canada) as recommended by the manufacturer. Reverse transcription products were diluted 10 times in pure water prior to real-time quantitative PCR. Gene expression levels were determined using TaqMan primer and probe sets from the Universal Probe Library (<https://www.roche-applied-science.com>), sequences are available

upon request. PCR reactions were performed in 384-well plates using 1,5µl of cDNA sample, 0,25µM of primers and 1 µM of the TaqMan probe, 5µl of TaqMan PCR FastMix (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) in a total volume of 10 µl per well. The ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) was used to detect the amplification levels. All reactions were run in triplicates and average values calculated. Two housekeeping genes, actin and HPRT were used as endogenous controls. Relative expression levels of target genes and SD values were determined using the  $\Delta\Delta\text{CT}$  method. All RT-PCR experiments were conducted one time.

### ***RNA extraction, purification and DNA microarrays***

MCF-7 cells were starved over-night before treatment. They were treated in with E2 25nM and/or TSA 300nM or by vehicle for 3hr or 24hr. Total RNA were extracted as mentioned before with TRI-reagent (Sigma-Aldrich) and purified with RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, Mississauga, Canada). cRNA synthesis from total RNA, labeling and hybridization to Illumina WG-6 expression microarrays were performed at the Genome Quebec and McGill University Innovation Center using standard protocols (<http://www.genomequebec.mcgill.ca/>). The triplicates of the four treatment conditions were hybridized and analysed on 12 chips.

### ***Bioinformatic analysis***

Microarray analysis was performed with the Bioconductor packages lumi and limma (Du *et al.*, 2008; Smyth, 2005). Genes deemed significantly regulated were those with  $\geq 1.4$ -fold change between vehicle and treatments, average log<sub>2</sub>-expression levels greater than 5 across all samples (A-value) and a p-value for moderated t-statistics (Smyth, 2004) smaller than 0.01. P-values were adjusted to control the false discovery rate with the Benjamini and Hochberg method (Benjamini *et al.*, 1995). These thresholds were chosen based on the observed regulation of known ER targets,

such as TFF1, in a previous microarray study of primary and secondary estrogen target genes (Bourdeau et al., 2008).

Enrichment of ER $\alpha$  bound regions in a ChIP-on-chip experiment (Carroll *et al.*, 2006) within 25 kbp of the TSS of regulated genes was evaluated with the p-value of a Fisher exact test. A low p-value indicates that the proportion of genes with, at least, one ER $\alpha$  bound region is greater than would be expected by chance. Fisher exact tests were done with the “fisher.test” function of the R language (R Development Core Team, 2008). The fold enrichment is calculated as the number of ER $\alpha$  bound regions per gene, in the promoters of the regulated genes on the microarrays, divided by the number of ER $\alpha$  bound regions per gene for all genes in the genome (i.e. 25kb Only E2 3hr  $0.942 / 0.274 = 3.44$ ).

Association of regulated genes with biological processes was obtained with CoPub text mining tool (Kestler *et al.*, 2005). Venn diagrams were generated with VennMaster (Kestler *et al.*, 2005).

## RESULTS

### ***ICI and SAHA combined treatment synergically represses ER $\alpha$ -positive, but not ER $\alpha$ -negative, breast cancer cell proliferation.***

First, the impact of ICI and SAHA on the proliferation of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7 was assessed. For this purpose, cells were treated by the drugs alone or in combination, using constant dose ratios. Their growth was monitored by the colorimetric assay MTS, as described in material and methods. As expected, ICI and SAHA both repress MCF-7 cell proliferation; however combined treatment results in an increased repression of the proliferation in a dose- and time-dependent manner (fig.1A and fig S1). In fact, ICI and SAHA combined treatment seems to increase their kinetic on repressing MCF-7 cell growth (fig. S1). Cell death is also occurring in a dose- and time-dependent manner (fig. S1).

In order to determine whether the combined treatment demonstrates a synergistic action on inhibiting MCF-7 cell proliferation, Chou and Tallalay combination index equations were used through CalcuSyn software. The ED50 (representing 50% of the effective dose) of the drugs, alone or in combination, were calculated from the median effect plot resulting from 5 days of treatment of the cells (data not shown). Their values indicate that the combined treatment, in a constant equimolar ratio, is more potent than both agents alone to repress MCF-7 cell proliferation (EC50 of ICI: 988nM, SAHA: 678nM and ICI and SAHA in combination: 196nM). The combination index values (CI) around 0.5 demonstrates a strong synergy between ICI and SAHA in inhibiting MCF-7 cell proliferation (fig. 1B). The isobologram graphic illustrates the strength of the synergy since the CI values didn't significantly differ with doses variations (fig. 1B), from ED50 to ED90 on figure 1C. This is further assessed by the preservation of the synergy with other drug ratios: 1:2, 2:1 or 1:3, even if the CI values are increasing with the ratios (fig. S2). In the same extent, the synergy is stable in time from 4 to 6 days and decreases after 7 days of treatment (data not shown). These observations led us to conclude that

ICI and SAHA combined treatment synergistically inhibits ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cell proliferation.

ICI and SAHA combined treatment is more potent in ER $\alpha$ -positive (MCF-7 or ZR-75) than in ER $\alpha$ -negative (MDA-MB-231 or SK-BR3) breast cancer cells to inhibit cell proliferation (fig. 2A). In fact, ICI has no impact on ER $\alpha$ -negative cell growth, and ICI and SAHA combined treatment has the same effect as SAHA alone (fig. 2B). On the contrary, in ZR-75 cells, ICI and SAHA demonstrate a synergistic effect in inhibiting cell proliferation with stable CI values around 0.7 (fig. 2C).

To conclude, ICI and SAHA combined treatment synergistically inhibits ER $\alpha$ -positive breast cancer cell proliferation; although it doesn't potentiate SAHA's growth inhibition of ER $\alpha$ -negative breast cancer cells. Since ICI and SAHA are both known to influence cell cycle progression, the impact of the combined treatment on cell proliferation might result from its regulation.

***ICI and SAHA cooperate to block cell cycle progression of ER $\alpha$ -positive but not ER $\alpha$ -negative breast cancer cells through transcriptional regulation of cell cycle implicated genes***

In order to determine the impact of ICI and SAHA combined treatment on the cell cycle progression of breast cancer cells, they were treated by ICI and SAHA in combination (ratio 1:1) or as single agent, under E2 stimulation, for 24hr to 48hr. Cell cycle phase distribution of the cell was estimated by cell nuclei staining with propidium iodine, as detailed in materials and methods. As expected, ICI induces a large accumulation of cells in G1 phase at 24hr, and in a lesser extent at 48hr. After 24hr of E2 and ICI exposure, 93% of the cells are in G1 phase compared to 46% under E2 exposure only; and 76% compared to 52% at 48hr, respectively (Figure 3A). On the other hand, SAHA induces an accumulation of cells in G1 phase after 24hr of treatment, from 46% in presence of E2 only to 61% in presence of E2 and SAHA. After 48hr, SAHA causes an accumulation of cells in G1 (from 52% under E2 stimulation only to 68% in presence of E2 and SAHA) but also in G2/M phases

(from 13% with E2 only to 16% with E2 and SAHA). Finally, ICI and SAHA concomitant treatment induces a strong cell cycle arrest in G1 at 24hr: 91% of the cells are in G1 phase. This effect is mostly due to ICI, which probably masks SAHA's effect on the cell cycle. The dual effect of SAHA on MCF-7 cell cycle after 48hr of treatment is reflected in the impact of ICI and SAHA co-treatment since the cell cycle progression is blocked in G1 and G2/M with 77% of the cells accumulating in G1 phase and 16% in G2/M phase. In fact, the cell cycle progression inhibition induced by ICI and SAHA seems to result from the addition of their effects as single agents: the blockage in G1 could result from ICI and the blockage in G2/M from SAHA. On the contrary, ICI has no impact on the cell cycle progression of ER $\alpha$ -negative breast cancer cells, MDA-MB-231, after neither 24hr nor 48hr of treatment (Figure 3B). ICI and SAHA concomitant treatment displays the same effect as SAHA treatment, 15% and 16% of the cells accumulated in G2/M phase under E2 and SAHA exposure compared to 11% and 10% under E2 stimulation only after 24hr and 48hr of treatment, respectively. These results seem to highlight that SAHA's impact on the cell cycle has 2 components, an ER $\alpha$  independent cell cycle arrest in G2/M phase, which occurs in ER $\alpha$ -positive and -negative cells, and an ER $\alpha$  dependent cell cycle arrest in G1 phase, displayed only in ER $\alpha$ -positive cells. As a consequence, adding SAHA to ICI treatment in MCF-7 ER $\alpha$ -positive breast cancer cells tends to demonstrate a stronger cell cycle arrest, since SAHA adds an ER $\alpha$ -independent component to the ICI-induced ER $\alpha$ -dependent blockage of the cell cycle progression. The cooperative effect of ICI and SAHA combined treatment on the repression of the cell cycle progression could be one of the components explaining the synergistic inhibition of ER $\alpha$ -positive, but not ER $\alpha$ -negative, breast cancer cells. ER $\alpha$  being a transcription factor, and the possible repression of the ER $\alpha$ -dependent component of the cell cycle progression by ICI and SAHA combined treatment, lead to the hypothesis that transcriptional modulation of gene regulating the cell cycle is implicated.

In order to assess the role of the transcriptional regulation of genes implicated in the cell cycle progression, in ICI and SAHA cooperative effect, mRNA expression



of such genes were monitored by qPCR. Total RNA were extracted from MCF-7 cells under E2 stimulation and treated, for 1hr to 24hr, by ICI and SAHA as single agents or in combination. For most of the cell cycle gene tested: CDC25A, CCND1, CCNA2, E2F2, E2F8 and E2F1, ICI and SAHA alone both down-regulate their expression with a maximal effect around 3hr (figure 4 and data not shown). Although, after 6hr of exposure, the same genes show a stronger transcriptional down-regulation in response to ICI and SAHA combined treatment compared to both agents alone. Before 6hr, the opposite is observed. It seems that ICI and SAHA cooperation on the transcriptional regulation of genes implicated in the cell cycle progression is postponed. This cooperative effect of ICI and SAHA on these genes illustrates their additive effect to repress cell cycle progression of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. What is interesting in the transcriptional regulation of these genes by ICI and SAHA is that all of those displaying a cooperative effect are E2-target genes, and are regulated in an opposite way in presence of E2 compared to E2 and SAHA.

***TSA conceals estrogen-mediated transcriptional regulation with different mechanisms at 3hr and 24hr***

In order to achieve a better understanding of HDACi impact on global gene transcription, especially on E2-stimulated pathways in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells, the global gene transcription of MCF-7 cells exposed to E2 and/or high dose of TSA (300nM) for 3hr or 24hr were monitored using whole genome arrays. As expected, after 3hr of treatment, the vast majority of E2-regulated genes are known primary E2-target genes (90% of E2-regulated genes); while after 24hr of treatment, 67% of E2-regulated genes are secondary E2-target genes (data not shown). Surprisingly, 3hr of treatment were sufficient for TSA to conceal E2 effect on gene transcription: in the presence of E2 and TSA, gene transcription folds don't correspond to the addition of E2's effect and TSA's effect but rather to TSA's effect +/- 10% (data not shown). This is illustrated by the comparison between the gene expression folds in response to TSA exposure in presence or absence of E2 stimulation, which results in a linear regression with a slope of 0.91 (Figure 5A). At

24hr, this phenomenon is also very convincing since the fold of gene transcription in response to the co-treatment E2 and TSA corresponds to the fold in presence of TSA alone +/-2% ,the slope of the linear regression being 0.98 and the  $R^2$  0.99 (Data not shown and Figure 5A).

To further examine the impact of TSA on E2 regulated genes, we distinguished two classes: the genes regulated only by E2 and those regulated by E2 and TSA. This last category was sub-divided into 3 sub-classes depending of the impact of TSA on E2 regulation: (i) E2 and TSA cooperate on the gene transcriptional regulation, (ii) E2 regulation is attenuated by TSA, (iii) E2 regulation is inactivated by TSA (figure 5B). At first glance, it is interesting to note that the duration of the treatment has an impact not only on the proportion of gene regulated by E2 or E2 and TSA, but even more on the sub-classification of the genes regulated by E2 and TSA. At 3hr, the majority of E2-target genes are only regulated by E2: 61.5% of the total genes regulated at 3hr. In the case of the genes regulated by E2 and TSA, 48% display an E2 regulation attenuated by TSA; also E2 and TSA cooperate to regulated gene expression for 29% of them; finally TSA inactivated E2 effect in 23% of them. With longer exposure to the drugs, the proportion of E2-only regulated genes decreases to 46% at 24hr. From the 54% of genes regulated by E2 and TSA, 90% are inactivated by TSA. As a conclusion, TSA conceals E2's effect on gene transcription as soon as 3hr of treatment. Although, its impact on E2 regulated gene seems to be different at 3hr and 24hr: at 3hr TSA mostly attenuated E2 signaling, although at 24hr TSA deactivates it in 90% of the case.

Since the proportion of primary and secondary E2-target genes varies with the duration of the treatment, the proportion of ER $\alpha$  bound region near regulated genes should be different too. The distribution of the genes according to their sensitivity to TSA exposure in the 4 categories was examined. As expected, the global frequency of ER $\alpha$  bound regions near E2 up-regulated genes (from 2.5 to 25kb) shows superior and significant fold enrichments at 3hr compared to 24hr, with a 5.0 to 6,5 for E2 up-regulated genes at 3hr, and 1.7 to 2.7 for E2 up-regulated genes at 24hr (data not shown). Only E2-regulated gene display comparable enrichment folds (figure 6A). At 3hr, the "E2 and TSA cooperates" genes, and those for which E2 impact is attenuated

by TSA, present a strong and significant enrichment of ER $\alpha$  bound regions in the vicinity of their genes, from 9.2 to 13.5 and 6.1 to 10.0 respectively, which represents folds 2 to 4 times higher than the ones for “E2 only” genes (figure 6A). On the contrary, E2 regulated genes inactivated by 3hr of TSA exposure do not show any significant enrichment of ER $\alpha$  bound regions. At 24hr, the frequencies of ER $\alpha$  bound regions near regulated genes are comparable between the 4 sub-categories of E2 regulated genes, with a weak increase in the “E2 attenuated by TSA” gene category which folds fluctuate between 3.1 to 4.1 depending on the distance between the promoter and the transcription start of the gene (from 2.5 to 25kb)(figure 6B). As a conclusion, exposure of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7 to high dose of TSA, in presence of E2 stimulation, conceals E2 impact on gene transcription with different mechanisms at 3hr and 24hr of treatment. Finally, E2 transcriptional signaling inactivation by TSA, at 24hr, suggests that ER $\alpha$  is not present anymore in the cell to regulate E2-target genes.

***HDACi depletion of ER $\alpha$  from ER $\alpha$ -positive breast cancer cell is potentiated by ICI co-treatment***

In order to determine whether the inactivation of E2 transcriptional signaling, occurring after 24hr of exposure to TSA, results from a decrease in ER $\alpha$  level in MCF-7 cells, cells were treated with E2 and TSA for 1hr to 24hr, then mRNA and protein levels were monitored. The q-PCR experiment results show a very strong abolition of ESR1 transcription in response to TSA treatment, with a maximum reached at 16hr and maintained at 24hr (figure 7A); this transcriptional effect correlates with ER $\alpha$  protein depletion from cells beginning at 16hr (figure 7B). These results allow us to conclude that TSA-induced abolition of E2 transcriptional regulation observed at 24hr, results mostly from ER $\alpha$  -mRNA and protein- depletion from the cells.

Since both ICI and SAHA individually induce ER $\alpha$  protein level reduction in cells (Fiskus *et al.*, 2007; Parker, 1993; Yi *et al.*, 2008), ICI and SAHA combined

treatment may reinforce that effect. To test this hypothesis, MCF-7 cells were treated by ICI and/or SAHA (at clinically relevant doses) or an high dose of SAHA in presence of E2. As TSA, high dose of SAHA also reduces ESR1 transcription and ER $\alpha$  protein (figure 7A and C). ICI and SAHA combined treatment stably represses ESR1 transcription from 1hr to 24hr (figure 7A). Besides, ER $\alpha$  protein levels are lower in response to the combined treatment compared to both drugs administered as single agents, with a maximal effect at 6hr and a complete depletion of ER $\alpha$  protein at 48hr (fig. 7C). As for the inhibition of the cell proliferation and the cell cycle progression, ICI and SAHA combined treatment seems to act faster than both drugs alone. The faster and stronger decrease of ER $\alpha$  protein in MCF-7 cells in response to ICI and SAHA combined treatment, compared to HDACi alone, should be reflected on E2-target gene expression regulation.

***Primary and secondary E2-target genes are not regulated in the same manner by ICI and SAHA combined treatment.***

In order to evaluate the impact of 1hr to 24hr exposure to SAHA alone or combined with ICI on E2-target gene transcription, q-PCR experiments were performed in MCF-7 cells. Unexpectedly, the regulation kinetics of E2-target gene transcription in response to the treatments, are different from primary to secondary E2-target genes (fig. 8) (as defined in (Bourdeau *et al.*, 2008)). ICI or SAHA, as single agents, are not sufficient to repress E2-dependent up-regulation of the transcription of primary E2-target genes between 6hr and 24hr (fig. 8A), even if those same treatments have already lowered ER $\alpha$  expression level as observed in figure 7C. Even so, ICI and SAHA concomitant treatment inhibits E2 up-regulation in all cases. Interestingly, ICI and SAHA (100nM and 300nM, respectively) combined treatment generally reproduces the effect of high dose of SAHA (1000nM), leading to the conclusion that ICI potentiates SAHA repressional effect on the transcription of primary E2-target gene. In the same extent, secondary E2-target gene regulation by SAHA is also potentiated by ICI, in some cases, as for the genes of DNMT1, E2F2, E2F8 or CDC25A (fig. 8B and 4). ICI and SAHA, as single agents, down-regulate the

transcription of those genes and then repress their E2 transcriptional up-regulation. Moreover, after 6hr of exposure to the combined treatment, ICI and SAHA cooperate to further down-regulate their expression compared to both drugs alone; but this effect is not strong enough to reach the impact of high dose of SAHA, as for primary E2-target genes. On the other hand, the repression of the transcription of other secondary E2-target genes by SAHA is not potentiated in presence of ICI co-treatment, as for the genes BIRC5, BRCA1, MCM7, NRIP1, E2F1 and EGR1 (fig. 8B and data not shown). Thus primary and secondary E2-target genes do not present the same pattern of transcriptional regulation in response to ICI and SAHA co-treatment. Primary E2-target gene transcription seems to be more sensitive to the drugs combination. Besides, the promoter regions of primary up-regulated E2-target genes are enriched in ERE binding sites (Bourdeau *et al.*, 2008), then we might expect that ICI and SAHA cooperative impact on primary E2-target gene acts through EREs.

***SAHA inhibits its own up-regulatory effect on ERE-dependent transcription through the decrease of ER $\alpha$  levels in cells.***

Studying the impact of increasing doses of SAHA should help understand the impact of SAHA alone on ERE-dependent transcription, and then give insight to primary E2-target gene transcriptional regulation. Furthermore, the addition of ICI to the treatments should help apprehend how ICI potentiates SAHA's effect on primary E2-target gene transcription.

To address these questions, the luciferase activity resulting from ERE-dependent transcription was measured, in MCF-7 cells transiently transfected and exposed to various doses of SAHA for 24h. Under E2 stimulation, SAHA has a dual effect on ERE-dependent transcription depending on its concentration. Between 300nM and 1000nM, SAHA increases ERE-dependent transcription in response to E2 stimulation with a maximum effect obtained at 500nM (fig. 9A). Further increase of SAHA concentration induces a return of the luciferase activity to the basal level. Additional escalation of SAHA concentration results in a decrease of ERE-dependent

transcription to levels comparable to those obtained in absence of E2 stimulation. In that last case, SAHA does not significantly influence ERE-dependent transcription whatever its concentration, except a light increase at 500nM, corresponding to the peak obtained under E2 stimulation. Abolition of E2 stimulation by ICI addition impaired ERE-dependent increase of the transcription whatever the concentration of SAHA, luciferase activity levels are comparable to those obtained in absence of E2. Then ER $\alpha$  degradation induced by ICI treatment prevents SAHA's up-regulation of ERE-dependent transcription. These results highlight the fact that the quantity of ER $\alpha$  available to induce ERE-dependant transcription might be the factor explaining the decrease of the luciferase activity with high doses of SAHA or in the presence of ICI and SAHA co-treatment.

To verify this hypothesis, the same luciferase experiment was conducted in cells over-expressing ER $\alpha$ . Under E2 stimulation, SAHA constantly increases ERE-dependent transcription in a dose-dependent manner to a plateau reached around 1500nM of SAHA (fig. 9B). Contrary to the results obtained with endogenous ER $\alpha$ , SAHA does not display dual effect on ERE-dependent transcription in the presence of over-expression of ER $\alpha$ . However, in both case, adding ICI inhibits SAHA's effect. ICI significantly reduces SAHA-induced augmentation of ERE-transcription. Then, over-expression of ER $\alpha$  impaired SAHA-induced ERE-dependent transcription decreased at high doses, demonstrating that it results from the reduction of ER $\alpha$  levels in cells.

As a conclusion, SAHA has a dual role on ERE-dependent transcription. From low to medium concentrations, SAHA increases ERE-dependent transcription in a dose-dependent manner; besides, high doses of SAHA decrease ERE-dependent transcription, leading to a complete abrogation of E2 stimulation impact, SAHA-induced depletion of ER $\alpha$  being responsible from its repressive impact on its own effect. The curves obtained then represent the balance between ER $\alpha$  degradation and ERE-dependent transcription stimulation. ICI addition to SAHA treatment mimics the effect of high dose of SAHA through ICI-dependent degradation of ER $\alpha$ .

## DISCUSSION

The emergence of the HDACi compounds opens new doors for the treatment of cancer. In the ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cell line, clinically usable concentrations of SAHA stop cell growth, induce reversible differentiation and low apoptosis (Munster *et al.*, 2001). But the only FDA approved HDACi, SAHA, has been shown to have a low impact on breast tumor growth in patient as a single agent (Finnin *et al.*, 1999; Luu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2005). Nevertheless, its association with other anti-neoplastic drugs seems promising. Indeed, pre-clinical studies demonstrate that SAHA cooperates with other anti-tumoral drugs. For example, SAHA potentiates the apoptosis induced by the TRAIL-agonist receptor in breast cancer cells (Singh *et al.*, 2005), or the cytotoxic effect of the cisplatin in MCF-7 cells (Kim *et al.*, 2003). In our study, SAHA has been associated with ICI, in order to determine whether an HDACi and a full anti-estrogen can cooperate to block breast cancer cell proliferation. In fact, our results demonstrate that ICI and SAHA have a synergistic effect on inhibiting ER $\alpha$ -positive - but not ER $\alpha$ -negative - breast cancer cell proliferation, which could implicate, at least in part, their cooperation to block cell cycle progression. From a mechanistic point of view, those effects rely on a cooperative effect of ICI and SAHA on gene transcription and on ER $\alpha$  depletion from cells. High doses of HDACis completely and rapidly mask E2-transcriptional signaling in MCF-7 cells. More precisely, the HDACi-induced loss of ER $\alpha$  in cells seems to inhibit its own HDACi-induced up-regulation of ERE-dependent gene transcription. ICI potentiate the repressional effect of SAHA on ERE-dependent transcription by lowering the threshold, through its induction of ER $\alpha$  degradation.

Even if the capacity of full anti-estrogens to repress ER $\alpha$  activity does not rely on HDACs enzymatic activities - unlike partials anti-estrogen (Margueron *et al.*, 2004) - it was important to verify that HDACis allow ICI to keep its repressive activity on E2-mediated signaling pathway. Actually, HDACis do not inactivate or transform the full anti-estrogen ICI into a partial agonist. In fact, ICI effect on cell

proliferation (figures 1 and 2), cell cycle progression (figures 3 and 4), ER $\alpha$  degradation (figures 7) or transcriptional inhibition of E2-target genes (figures 8 and 9), are not impaired by the presence of HDACis but rather potentiated.

This combined treatment demonstrates a synergistic inhibitory effect on ER $\alpha$ -positive, but not ER $\alpha$ -negative, breast cancer cell proliferation (figure 1 and 2). Chou and Tallalay equations (Chou *et al.*, 1984) applied on MCF-7 and ZR-75-1 cell line growth curves show a strong synergy with combination index values around 0.5 and 0.7, respectively, in the presence of ICI and SAHA at an equimolar ratio (figure 1 and 2). The stability of the combination index values (through the use of various doses, from ED50 to ED90 as represented in the isobolograms, for example) and various ratios or treatment durations (from 3 to 7 days), assess its strength (figure suppl1 and suppl2).

The synergistic impact of ICI and SAHA on the proliferation of cells might result, at least in part, from their impact on the cell cycle progression. On the one hand, ICI induces a strong cell cycle arrest during the G1 phase at 24hr in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells, and its effect is maintained, but reduced, at 48hr (figure 3). On the contrary, ICI has no impact on ER $\alpha$ -negative cell cycle. On the other hand, SAHA provokes an ER $\alpha$ -dependent cell cycle arrest in G1 at 24hr and 48hr, observable only in ER $\alpha$ -positive cells; and an ER $\alpha$ -independent accumulation of cells in G2/M, mostly occurring at 48hr, in ER $\alpha$ -positive and -negative cells. These results are consistent with other's (Alao *et al.*, 2004; Bolden *et al.*, 2006; Reid *et al.*, 2005). Finally, ICI and SAHA in a combined treatment seems to display additive effects on the cell cycle progression, which result in a strong cell cycle arrest in G1 phase at 24hr and in G1 and G2/M phases after 48h of ER $\alpha$ -positive cells exposure to the drugs. Thus, the synergistic inhibitory effect of ICI and SAHA combined treatment on ER $\alpha$ -positive cell proliferation might result, at least partially, from their possible additive impact on blocking the cell cycle progression of these cells. The fact that ICI and SAHA combined treatment of ER $\alpha$ -negative cells do not display a greater effect than the exposure to SAHA alone, correlates with the results obtained for cell proliferation.



Interestingly, ICI and SAHA putative additive effect on blocking the cell cycle progression of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells correlates with their cooperative effect on the transcriptional regulation of genes implicated in the cell cycle regulation, such as the cyclin D1 gene (CCND1) or the genes of various E2F family members, for example. Cyclin D1 is implicated in the G1/S phase cell cycle transition. As observed in MCF-7 cells, SAHA or TSA decreases the transcription of CCND1 (figure 4 and data not shown). Those results correspond to the known TSA down-regulation CCND1 transcription in an ER $\alpha$ -dependent mechanism and to the degradation of its protein in an ER $\alpha$ -independent manner, resulting in a G1/S cell cycle arrest (Alao *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005). By contrast, in MDA-MB-231, TSA induces cyclin D1 degradation but has no impact on its transcription. In these cells, TSA induces an accumulation of cells in G2/M phase (Alao *et al.*, 2004), as we observed under SAHA exposure (figure 3). The regulation of the cyclin D1 gene expression participates to the differential cell cycle regulation of ER $\alpha$ -positive and -negative cells. In addition, CCND1 is an up-regulated E2-target gene; consequently, ICI represses this E2-regulation, which results in a potentiation of SAHA down-regulation. These observations give insight on the mechanism of the cooperative effect of ICI and SAHA to block ER $\alpha$ -positive cell cycle progression. Similar cooperative regulation occurs with other genes implicated in the regulation of the cell cycle progression, such as CDC25A, CCNA2 and E2F family members, underlying the additive effect of ICI and SAHA in blocking the cell cycle progression of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. It is also interesting to note that all the genes implicated in the cell cycle regulation have revealed themselves to be E2-target genes. In addition, 43% of the gene presenting an opposite regulation by E2 and TSA, can be classified as cell cycle implicated genes (figure S3), which lead to think that the observed cell cycle gene regulation is a pattern not limited to the genes tested. Also, 34% of the genes presenting an opposite regulation by E2 and TSA were classified as genes implicated in apoptotic pathways, as BIRC5, for example (figure S3). In addition, the reduction of the anti-apoptotic signals of E2 by ICI and the potentiation of the pro-apoptotic pathways by SAHA (Munster *et al.*, 2001), could result in increasing the apoptosis in ER $\alpha$ + breast cancer cells co-treated by ICI and SAHA. In

this context, apoptosis might be another pathway implicated in ICI and SAHA synergistic effect on ER $\alpha$ + breast cancer cell proliferation.

As a conclusion, ICI and SAHA synergistic effect on the repression of ER $\alpha$ -positive breast cancer cell proliferation results, at least in part, from the possible cooperative effect of the drugs on the cell cycle progression inhibition, which in turn seems to rely on the same cooperative effect on the transcription of E2-target cell cycle regulating genes.

In order to further study the impact of HDACis on E2-regulated genes, which seems to be implicated in the occurrence of the synergy, the whole genome transcriptional regulation of genes under E2 and/or TSA stimulation was monitored by DNA microarrays. Surprisingly, on high dose of TSA rapidly conceals E2-mediated transcriptional gene regulation, even if ER $\alpha$  receptor is still present at 3hr, and while the distribution of E2-target genes also regulated by TSA varies from 3hr to 24hr of treatment (figure 5). Enrichment of ER $\alpha$  bound regions near regulated genes (from 2.5kb to 25kb from the TSS) varies according to their regulation patterns in response to E2 and TSA, but also according to the treatment duration (figure 6). Moreover, at 3hr, E2 stimulation still has a significant impact on gene transcription; while at 24hr, E2 regulation is inactivated by TSA for 90% of E2-target genes regulated by E2 and TSA. In addition, gene transcription levels in presence of E2 and TSA correspond to those in presence of TSA only +/- 2%. As expected, the inactivation of E2 transcriptional signaling after 24hr of TSA exposure results from the clearance of ER $\alpha$  (figure 7). Although various HDACis, among which TSA and SAHA, have been shown to decrease mRNA levels of ER $\alpha$  (Alao *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008), it has also been demonstrated that SAHA induces ER $\alpha$ 's protein degradation (Fiskus *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008). Indeed, TSA induces a drastic time-dependent inhibition of ER $\alpha$  gene transcription and depletion of ER $\alpha$  protein from the cells (figure 7). The repression kinetic of ER $\alpha$  expression at mRNA and protein levels, correlated with other group results showing that TSA acts on both levels. In fact, after 6hr of treatment, the TSA-induced decrease of ER $\alpha$  protein level seems higher than the decrease at mRNA level. SAHA

also induces the reduction of ER $\alpha$  protein levels, at least between 6hr and 24hr of treatment (figure 7). While compared to TSA, SAHA's impact on ER $\alpha$  expression (absence of effect at mRNA level) is lower, however SAHA still reduces ER $\alpha$  expression and correlated with the doses used. The mechanism, which implicates the hyper-acetylation of HSP90 through the inhibition of HDAC6 by TSA or SAHA, might be an explanation. Indeed, the hyper-acetylation of HSP90 diminished its association with ER $\alpha$  which is then ubiquitinated and degraded by the proteasome (Fiskus *et al.*, 2007). Interestingly, adding ICI to SAHA exposure further decreases ER $\alpha$  expression at protein (but not mRNA) level compared to either agent alone. The greater reduction of ER $\alpha$  expression by the combined treatment is another clue to the mechanism of the synergistic inhibition of ER $\alpha$ -positive breast cancer cell proliferation, since their growth is E2-dependent. The velocity of ER $\alpha$  protein clearance is still longer in presence of ICI and SAHA than TSA, 48hr compared to 24hr, but this can be easily explained by the use of a lower dose of SAHA, fitting clinically relevant doses of HDACi and anti-estrogen.

After 3hr of treatment with either TSA, SAHA alone or SAHA combined to ICI, ER $\alpha$  receptor is still present, even if the global regulation of genes in presence of E2 and TSA is consistent with the effect of TSA +/-10% (figure 7 and 5). At this time, E2 still has an impact on E2-target genes in presence of TSA, since the transcriptional regulation of more than half of them corresponds to E2 and TSA cooperation or to an attenuation of E2 effect by TSA. In addition, these two categories of gene present a strong enrichment of ER $\alpha$  bound regions in the vicinity of their promoter regions, even stronger than the one of genes regulated by E2 only (figure 6). These observations seem to highlight the fact that TSA has a direct and rapid effect on the regulation of E2-target genes and that the presence of EREs might be implicated. In the same extent, the enrichment of ERE binding sites in the promoters of primary up-regulated E2-target genes (Bourdeau *et al.*, 2008) explains the unexpected differential regulation of primary and secondary E2-target gene transcription by ICI and SAHA combined treatment (figure 8). In fact, while the regulation of secondary target genes shows diverse patterns of regulations in response

to ICI and SAHA combined treatment; ICI strongly potentiates SAHA repressional effect on the transcription of primary E2-target genes. Interestingly, primary E2-target genes show the same response in presence of the combined treatment ICI and SAHA as to a high dose of SAHA. In addition, the promoter region of the secondary target gene TFF1, which act as a primary target gene in regard to its transcriptional regulation by ICI and SAHA (figure 8), includes several ER $\alpha$  bound regions involving EREs (Bourdeau *et al.*, 2008; O'Lone *et al.*, 2004). To conclude, cooperative effect of ICI and SAHA on E2-target gene transcription clearly implies ERE binding sites.

The impact of HDACis on the regulation of ERE-dependent transcription is not fully understood yet. TSA has been shown to have a dual effect on ERE-dependent transcription in the ER $\alpha$ -positive endometrial cell line, Ishikawa, and the ER $\alpha$ -negative mammary cancer cell line, MDA-MB-231 (Jang *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2005). The dual effect of SAHA has not been highlighted before. As other HDACis, the consensus is that SAHA decreased E2-target gene expression, while one of Margueron *et al.* results shows that a low dose of SAHA increases ERE-dependent transcription in presence of E2 stimulation (Margueron *et al.*, 2004). More precisely, our results demonstrate that, from low to medium doses: SAHA clearly increases ERE-dependent transcription (figure 9). On the contrary, high doses of SAHA decrease ERE-dependent transcription. In fact, the decrease of ERE-dependent transcription induced by SAHA is an indirect effect which relies on ER $\alpha$  degradation. Indeed, ER $\alpha$  over-expression impaired this effect and provokes a constant increase of ERE-dependent transcription. Then at high doses, it is highly probable that, SAHA decreases ERE-dependent transcription through the repression of ER $\alpha$  expression. This putative SAHA-induced reduction of ER $\alpha$  protein level, should provoke an inhibition of its own induction of the transcription of genes under ERE control. Moreover, ICI-dependent degradation of ER $\alpha$  mimics the degradation of ER $\alpha$  induced by high doses of SAHA. As a consequence, the presence of ICI in combined treatment with SAHA impairs the increase of ERE-dependent transcription by low doses of SAHA and allows lower doses of SAHA necessary to down-regulate ERE-

dependent gene transcription. Finally, the fact that ICI lower the threshold of SAHA's concentration needed to down-regulate the ERE-dependent expression of genes, explains the similar regulation of primary E2-target genes by high doses of SAHA or by the combined treatment of low dose of SAHA and ICI.

Even if ICI and HDACis' combination has never been tried before, the demonstrated synergy was not completely surprising given the potentiation of Tamoxifen effects by HDACis in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells (ref in (Thomas *et al.*, 2009)) (Bicaku *et al.*, 2008; Hirokawa *et al.*, 2005). On the contrary, the total absence of cooperative effect of ICI and SAHA combined treatment, in ER $\alpha$ -negative breast cancer cells, might seem contradictory with the sensibilisation of these last cells to tamoxifen treatment in the presence of SAHA (Fan *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2004). However, the implication in the synergy of ER $\alpha$  degradation and E2-target gene expression silencing are clues to explain the absence of cooperation between the full anti-estrogen ICI and SAHA to repress ER $\alpha$ -negative breast cancer cell proliferation, or cell cycle progression. This absence of synergy in ER $\alpha$ -negative breast cancer cells would restrict ICI and SAHA combined treatment to ER $\alpha$ -positive breast cancer only; in addition it points out the fact that ER $\alpha$ -negative cells won't be affected by the synergy. This observation illustrates the selectivity of the ICI and SAHA combined treatment, which adds another level to SAHA's targeted effect in transformed cells preferentially to normal cells (Duvic *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2005).

Finally, the synergistic impact of ICI and SAHA combined treatment are promising for breast cancer therapy. From a mechanistic point of view, the cooperation of the two agents in inhibiting E2-mediated signaling pathways through ER $\alpha$  expression down-regulation and E2-target gene transcriptional regulation allow the use of lower doses for more rapid and targeted impact on ER $\alpha$ -positive breast cancer cells. It would be interesting to further characterize this synergy in rodent models in order to assess the potential toxicity decrease for non-transformed tissues and the possibility to reduce the efficient doses.

## FIGURES AND LEGENDS

### Figure 1

#### ***Synergistic effect of ICI and SAHA combined treatment on the repression of ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cell proliferation.***

A. ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7 were treated by E2 10nM and exposed to various doses of ICI and SAHA separately or in combined treatment. Dose-response curves were obtained after 5 days of treatment at indicated concentrations. Combined treatments ICI and SAHA were used at constant ratios of doses: equimolar 1:1, 1:2 or 2:1. Cell proliferation was quantified by MTS colorimetric assay, as described in material and methods. Curves represent the ratio of the control value in E2-treated cells. The mean of triplicates for each concentration was used. These experiments were repeated at least three times.

B. and C. Combination index (CI) plots (B.) and Isobologram analysis (C.), obtained with the CalcuSyn software. Combination index curve is represented with 95% confidence intervals. Dotted line, combination index = 1. Isobologram's points represent the concentration of both drugs that result in a MTS activity that is 10% (blue), 25% (green) or 50% (red) of the control without treatment, respectively ED90, ED75 and ED50. The dotted lines represent additivity. CI values obtained for concentrations corresponding to ED50, ED75 and ED90 are notes below the isobolograms. According to Chou, Talalay and Hayball, CIs of 0.3 to 0.5 indicate strong synergism, 0.5 to 0.7 indicate synergism, 0.7 to 0.85 indicate moderate synergism, 0.85 to 0.9 indicate slight synergism, 0.9 to 1.1 indicate additivity, and greater CIs indicate antagonism (Chou *et al.*, 1984).

**Figure 2**

***Synergistic effect of ICI and SAHA combined treatment on the repression of ER $\alpha$ -positive but not ER $\alpha$ -negative breast cancer cell proliferation.***

*A. ICI and SAHA combination inhibits ER $\alpha$ -positive and ER $\alpha$ -negative breast cancer cell proliferation.* In the presence of E2 10nM, cells were treated for 7 days with ICI and SAHA at equimolar dose ratio combination 1:1 with concentrations from 19.5 to 5 000nM, as indicated. Cell proliferation was quantified by the MTS colorimetric assay as described in material and methods. Dose curves are represented as a ratio of the control value in E2-treated cells and were obtained using Prism software. Depending of the cell lines, the experiments were conducted twice or more.

*B. ICI and SAHA combination is more potent to inhibit proliferation than both drugs used as single agents, in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells ZR-75, but not ER $\alpha$ -negative breast cancer cells MDA-MB-231 and SK-BR-3.* Results were obtained in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells ZR-75 as described in A.

*C. CalcuSyn combination index plots (C.) and isobologram analysis (D.) show the synergistic effect of the equimolar combination of ICI and SAHA to repress the proliferation of ER $\alpha$ -positive breast cancer cells ZR-75.* Combination index curve is represented with 95% confidence intervals. Dotted line, combination index = 1. On isobolograms, points represent the concentration of both drugs that result in a MTS activity that is 10% (blue), 25% (green) or 50% (red) of the control, respectively ED90, ED75 and ED50, CI values are indicated. The lines represent additivity.

**Figure 3**

***ICI and SAHA cooperate to repress the cell cycle progression of ER $\alpha$ -positive but not ER $\alpha$ -negative breast cancer cells.***

*A. SAHA adds an ER $\alpha$  independent cell cycle arrest in G2/M to the ICI-induced ER $\alpha$ -negative dependent G1 cell cycle arrest in ER $\alpha$ -positive breast cancer cell line MCF-7.* MCF-7 cells were treated for 24h or 48h with ethanolic vehicle, ICI and/or SAHA under E2 stimulation. PI staining of the nuclei and analysis by flow

cytometry were conducted as described in material and methods. Results were analyzed with ModFit software. Histograms represent the percentage of cells in each phase in response to the treatments. Experiments were conducted at least 3 times, a typical experiment is shown.

*B. SAHA ER $\alpha$ -negative independent G2/M cell cycle arrest occurs in ER $\alpha$ -negative breast cancer cell line MDA-MB-231.* The results for the MDA-MB-231 cells were obtained as described in A.

#### **Figure 4**

***ICI and SAHA cooperate to repress the transcription of genes implicated in the cell cycle progression.***

ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7, under E2 stimulation, were treated for 1hr to 24hr with ICI and SAHA in combined treatment or as single agents. Transcriptional levels of gene expression were evaluated using q-PCR of reverse-transcribed mRNAs as described in material and methods. Results are represented as a fold of mRNA expression in ethanolic vehicle treated cells. These relative expression levels of genes and SD values represents triplicates and were determined using the  $\Delta\Delta$ CT method.

#### **Figure 5**

***TSA masks E2 signalization in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells.***

*A.* Comparison of the gene expression changes in MCF-7 ER $\alpha$ -positive breast cancer cells in response to TSA and combined E2 and TSA treatment. The x axis shows Log<sub>2</sub> transformed fold changes in gene expression after E2 and TSA treatment relative to the vehicle ethanolic control treatment. The y axis shows Log<sub>2</sub> transformed fold changes in gene expression after TSA treatment relative to vehicle control treatment. Each dark blue dot represent the expression fold of a gene and light blue dots, genes whose fold are not between -1.4 and +1.4.



B. Graphical representation of the proportion of genes regulated by E2 and the impact of TSA 300nM treatment on them. E2-regulated genes were classified into 2 classes: the genes only regulated by E2 and the ones regulated by E2 and TSA. Those last genes were sub-divided into 3 sub-classes : E2 inactivated by TSA ( fold TSA-10% < observed fold E2+TSA < fold TSA+10%), E2 attenuated by TSA (observed fold E2+TSA < fold E2+ fold TSA) and the genes for which E2 and TSA cooperate (observed fold E2+TSA > fold E2+fold TSA).

### **Figure 6**

***ER $\alpha$  bound regions near genes regulated by E2 only or E2 and TSA, after 3hr or 24hr of treatment.***

The occurrence of ER $\alpha$  bound regions in the promoters of the genes of the 4 sub-classes: E2 only, E2 and TSA cooperate, E2 attenuated by TSA and E2 inactivated by TSA, were compared to all genes in the genome. The promoter length varied used from +/- 25 kb of the transcriptional start TSS to +/- 2.5 kb. A one-tailed Fisher exact test was used to determine if ER $\alpha$  occurred in the promoters of a significant number of genes.

### **Figure 7**

***HDACis deplete ER $\alpha$  from cells at mRNA and protein levels, moreover ICI and SAHA cooperate to decrease ER $\alpha$  expression.***

A. MCF-7 ER $\alpha$ -positive breast cancer cells were treated for 1hr to 24h by TSA 300nM, SAHA 1000nM or ICI 100nM and SAHA 300nM, in presence of E2 10nM. Expression of ER $\alpha$  at mRNA level was evaluated using q-PCR of reverse-transcribed mRNAs as described in material and methods. Results are represented as a fold of mRNA expression in ethanolic vehicle treated cells. These relative expression levels of genes and SD values represents triplicates and were determined using the  $\Delta\Delta$ CT method.

B. ER $\alpha$  expression at protein level in MCF-7 cells was evaluated by western blot, after E2 10nM and TSA 300nM treatment for various times as indicated. Acetylated histone H4 (Ac-H4) protein levels were used to verify TSA potency and B-actin as a loading control. Experiments were conducted at least 3 times, a typical experiment is shown.

C. MCF-7 cells were treated with E2 10nM, ICI 100nM and/or SAHA 300nM during 3hr to 48hr as indicated. Protein expression of ER $\alpha$  was monitored by western blot. As in B, experiments were conducted at least 3 times, a typical experiment is shown.

### **Figure 8**

***Primary and secondary E2-target genes are not regulated in the same manner by ICI and SAHA combined treatment.***

ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7, under E2 stimulation, were treated for 1hr to 24hr with ICI 100nM and SAHA 300nM in combined treatment or as single agents, or SAHA 1000nM. Transcriptional levels of gene expression were evaluated using q-PCR of reverse-transcribed mRNAs, as described in material and methods. Results are represented as a fold of mRNA expression in ethanolic vehicle treated cells. These relative expression levels of genes and SD values represents triplicates, and were determined using the  $\Delta\Delta$ CT method. (A.) Primary and (B.) secondary E2-target genes were observed.

### **Figure 9**

***SAHA exerts an inhibitory effect on its own up-regulation of ERE-dependent transcription.***

A. In MCF-7 ER $\alpha$ -positive breast cancer cells, ERE-dependent transcription is increased by SAHA at low concentrations and repressed at high concentrations. Transient transfection of ERE3-TATA-Luc or TATA-Luc reporter vectors was carried out for 24h in MCF-7 cells as described in material and methods. pCMV-bGal

vector was also included for the normalization of the transfection. Cells were treated with ethanolic vehicle 0,1%, E2 10nM, ICI and/or SAHA at various concentrations, but a constant equimolar ratio for 24h. Cells were then harvested and analyzed for luciferase activity. Obtained values were normalized by b-galactosidase assay. Results are the mean +/- SD of triplicates and are expressed as the percentage of the luciferase activity of untreated cells in presence of E2.

*B.* The same experiment was conducted in MCF-7 cells over-expressing ER $\alpha$ . In this case, ERE-dependent transcription increases in a dose-dependent manner and shows no decrease with high concentrations of TSA or SAHA.

## ***SUPPLEMENTARY FIGURES AND LEGENDS***

### ***Supplementary Figure 1***

#### ***Combinatory effect of ICI and SAHA on the repression of ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cell proliferation.***

(A.) Kinetic of the inhibition of MCF-7 cell proliferation by ICI and SAHA, as single agents or in combined treatment. (B.) Dose-response curves of ICI and SAHA, alone or in combination, on MCF-7 cell proliferation, after 4, 5 or 7 days of treatment. ER $\alpha$ -positive breast cancer cells MCF-7 were treated by E2 10nM and exposed to various doses of ICI and SAHA separately or in combined treatment, for 1 to 7 days. Combined treatments ICI and SAHA were used at constant ratios of equimolar doses. Cell proliferation was quantified by MTS colorimetric assay, as described in material and methods. Curves represent the ratio of the control value in E2-treated cells. The mean of triplicates for each concentration was used. These experiments were repeated at least three times.

### ***Supplementary Figure 2***

#### ***Impact of ICI and SAHA dose ratios on their synergistic effect on the proliferation repression of ER $\alpha$ -positive MCF-7 breast cancer cell.***

CalcuSyn combination index plots and isobologram analysis of ICI and SAHA combination at constant ratios 1:2 (A.), 2:1 (B.) or 1:3 (C.). For the proliferation assay, MCF-7 cells were treated for 5 days in presence of E2 10nM with ICI or SAHA, alone or in combination, at various concentrations from 19,5 to 5 000nM. Proliferation repression was measured using MTS assay. Combination index curves are represented with 95% confidence intervals. Dotted line, combination index = 1. On isobolograms, dots represent the concentration of both drugs that result in a MTS activity that is 10% (blue), 25% (green) or 50% (red) of the control, respectively ED90, ED75 and ED50. Lines represent additivity.

**Supplementary Figure 3**

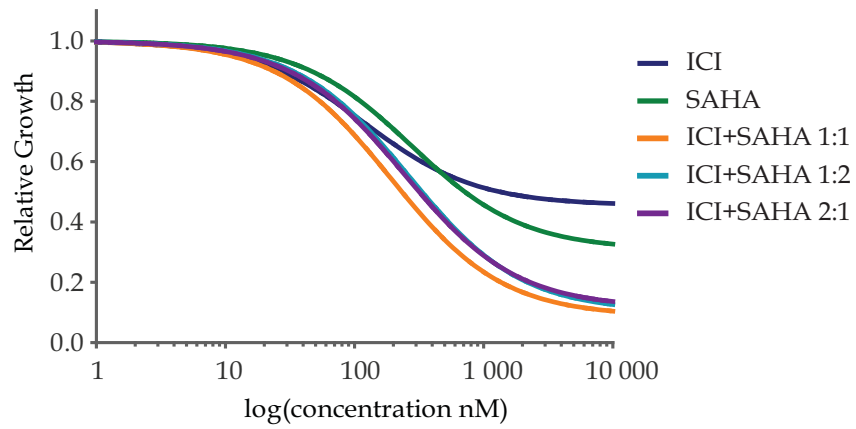
***Venn diagrams of regulated genes associated with apoptosis, cell cycle and proliferation.***

In order to identify the cellular processes on which E2 and TSA has an opposite effect, a gene set enrichment was conducted by CoPub using the 82 genes that were regulated in an opposite way by E2 and TSA in MCF-7 cells (Frijters *et al.*, 2008). CoPub is an online text mining tool that calculates which biological processes are significantly associated to a set of genes. Venn diagrams were generated with VennMaster (Kestler *et al.*, 2005).

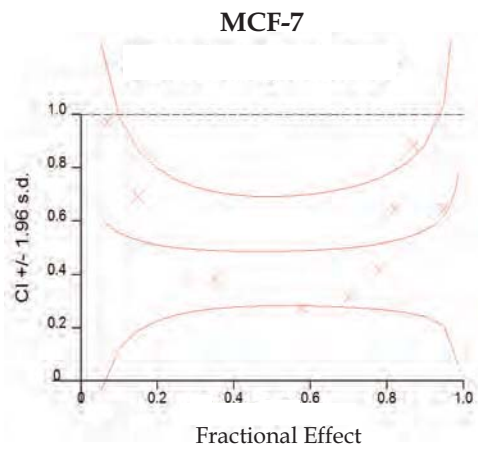


# Figure 1

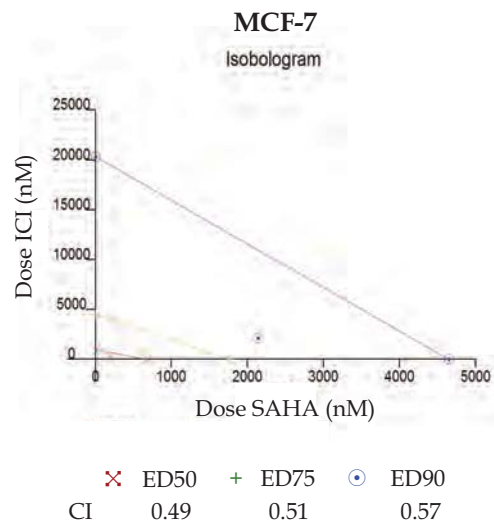
A.



B.

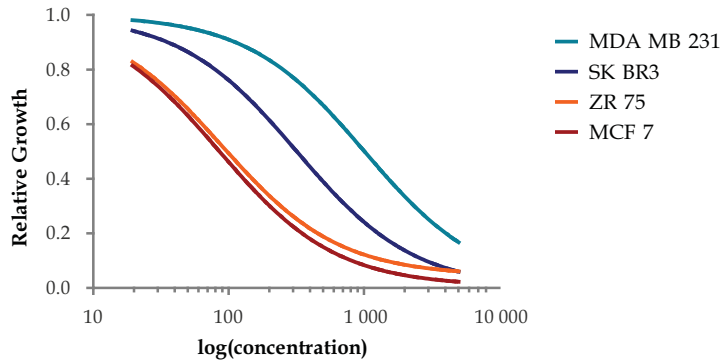


C.

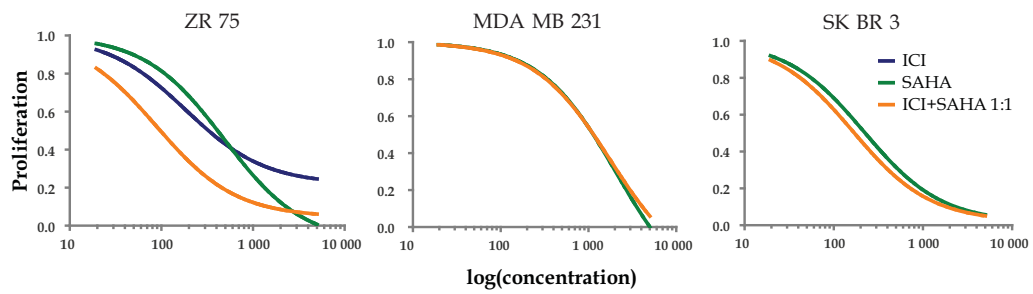


# Figure 2

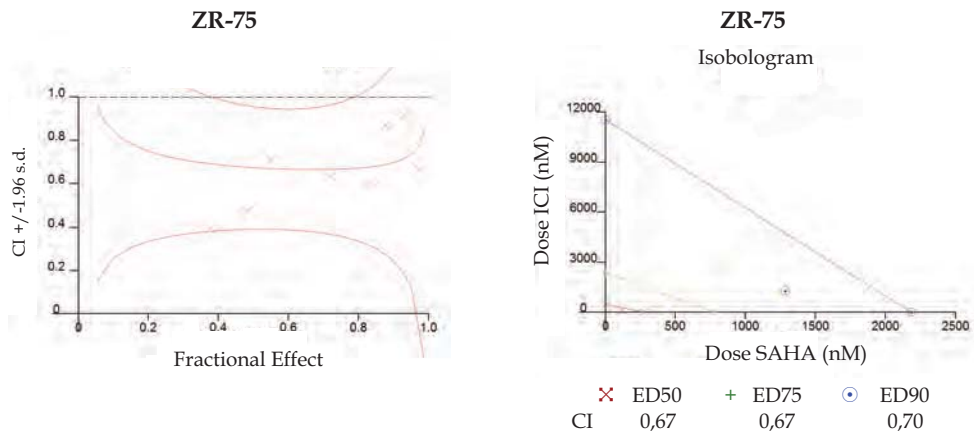
A.



B.



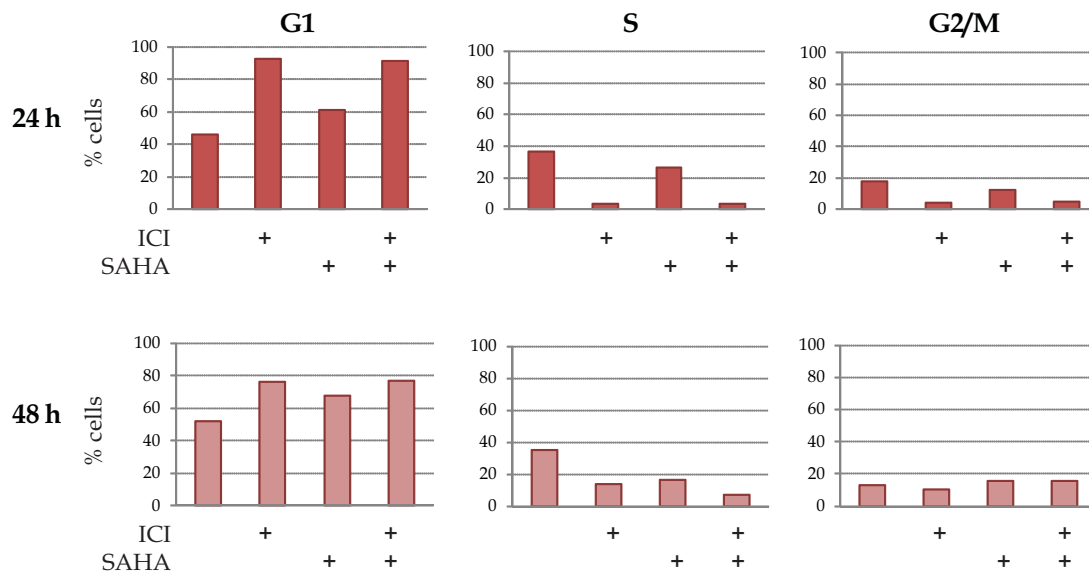
C.



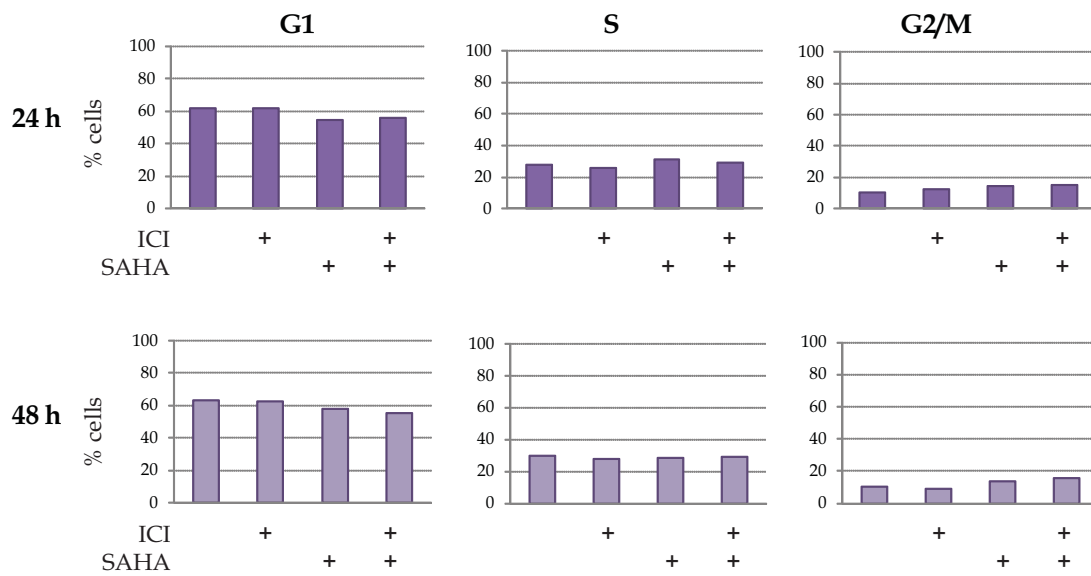


# Figure 3

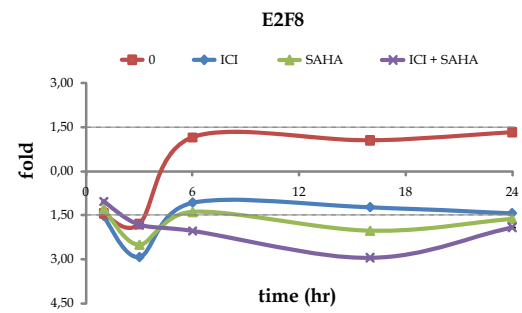
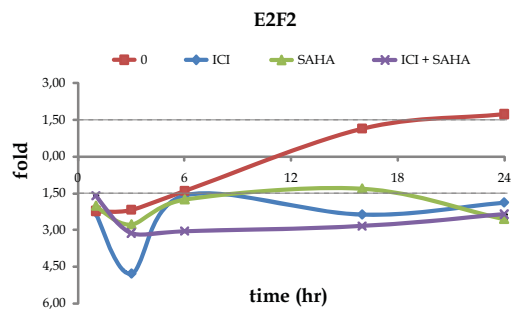
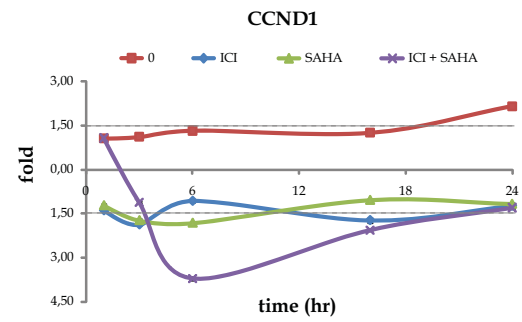
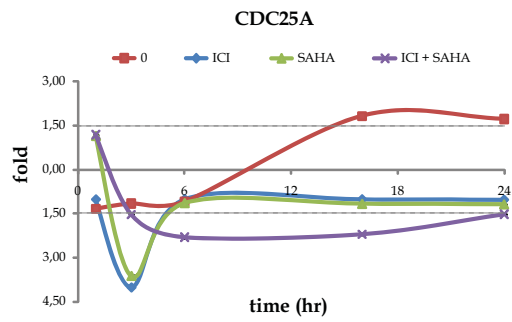
## A.



## B.

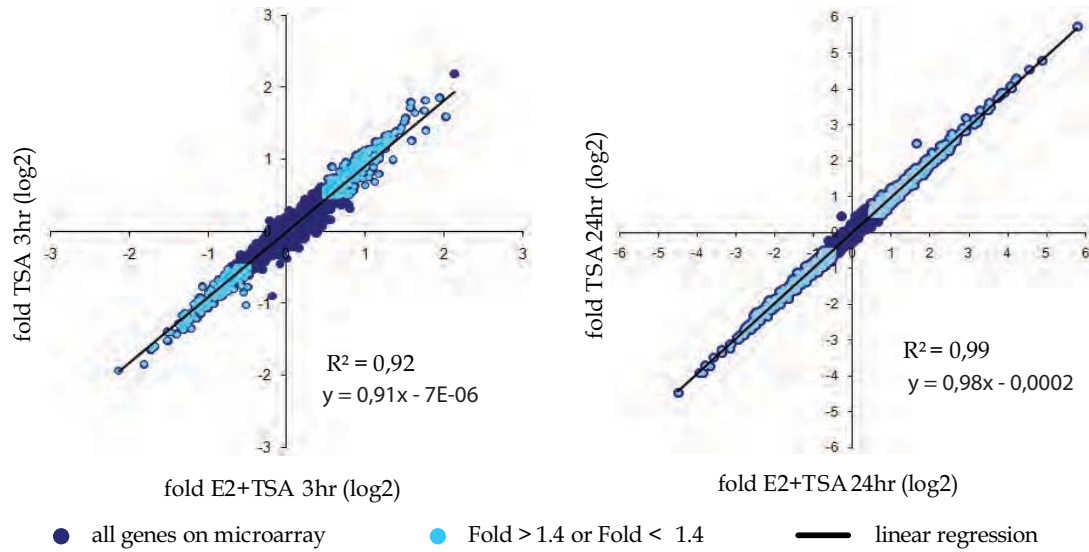


# Figure 4

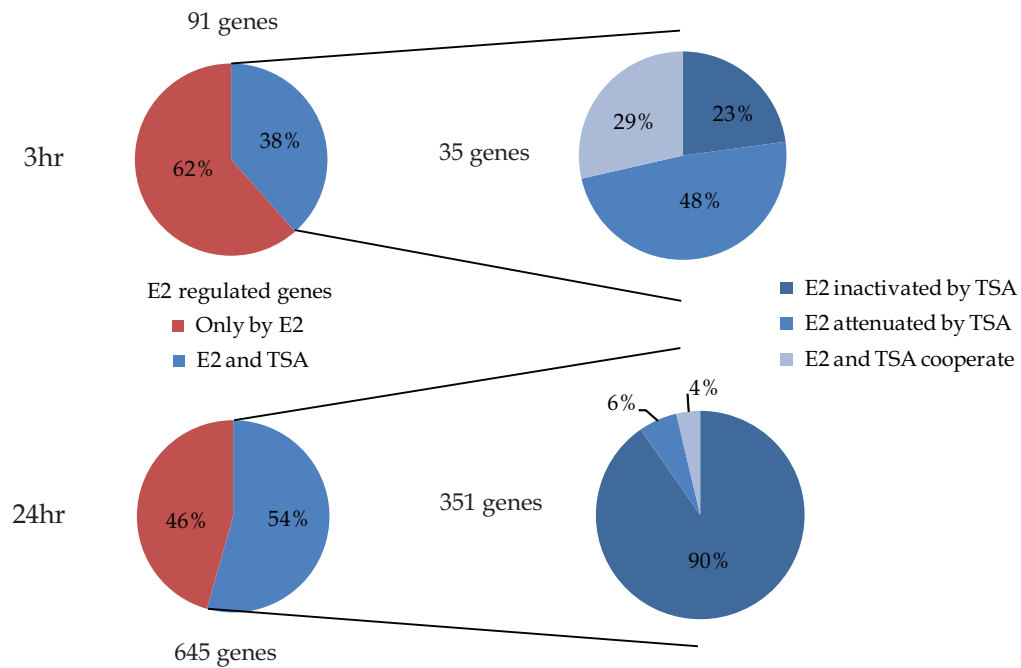


# Figure 5

A.



B.

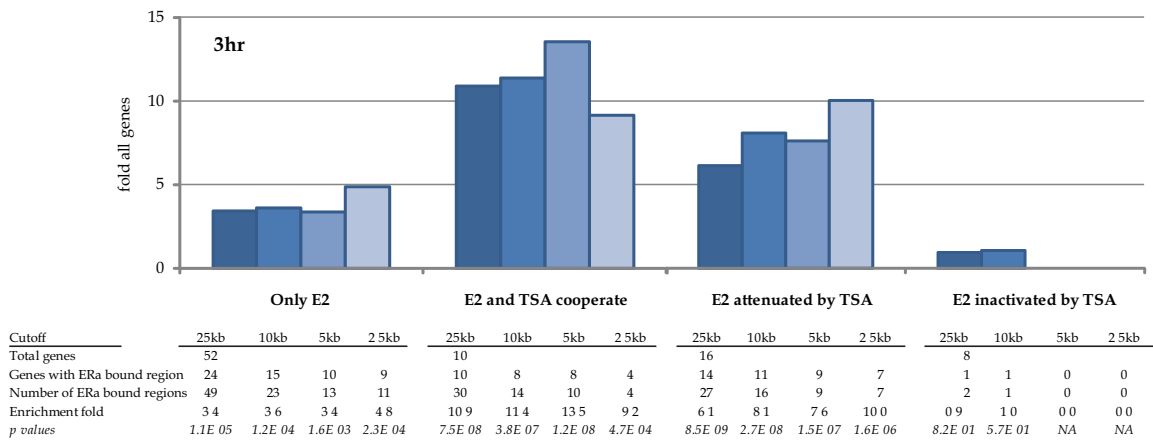


# Figure 6

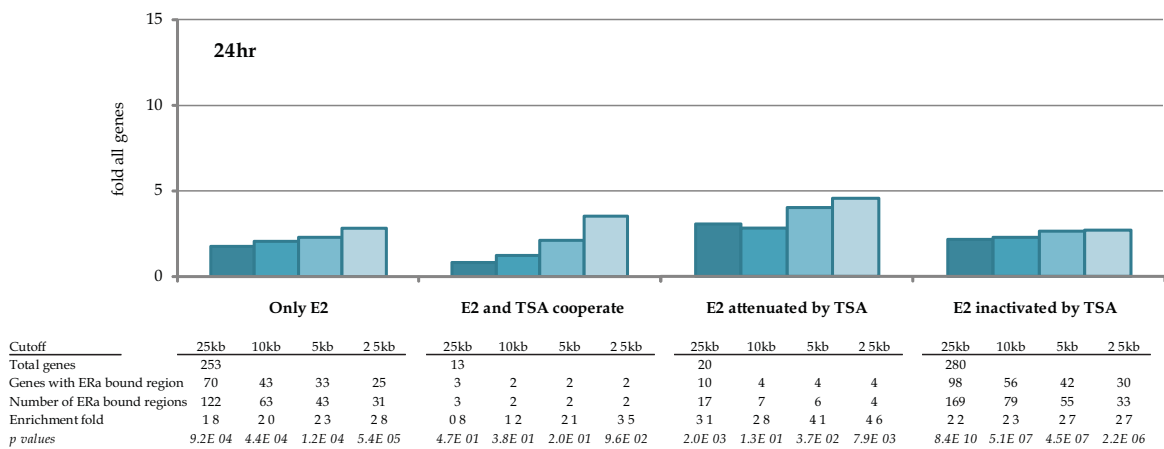
## ERa bound regions near regulated genes on microarrays

■ 25kb ■ 10kb ■ 5kb ■ 2.5kb

A.

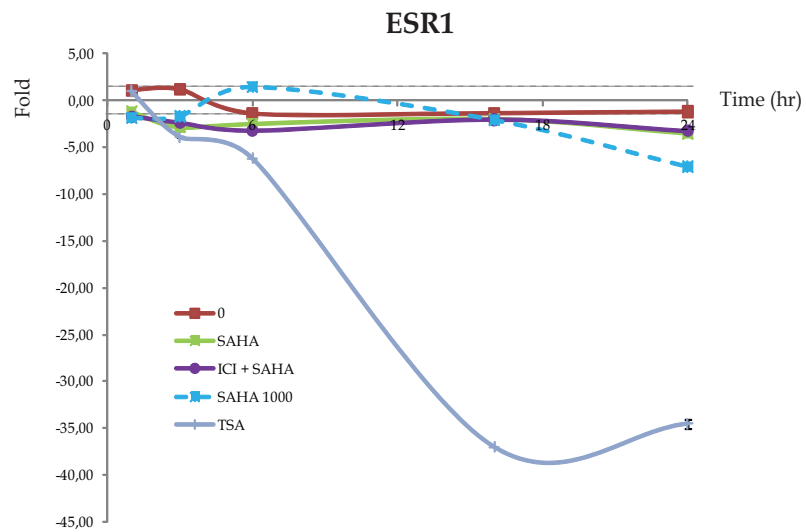


B.

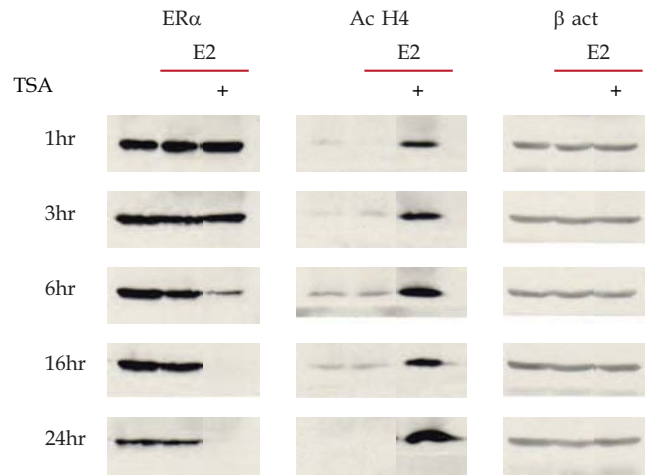


# Figure 7

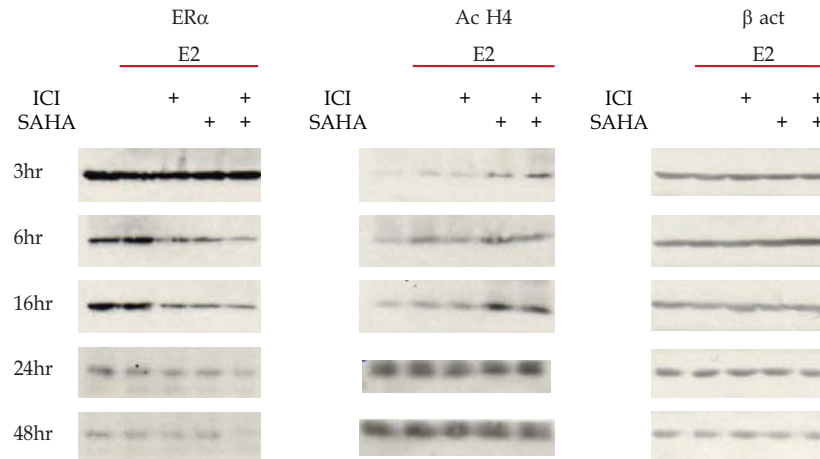
A.



B.

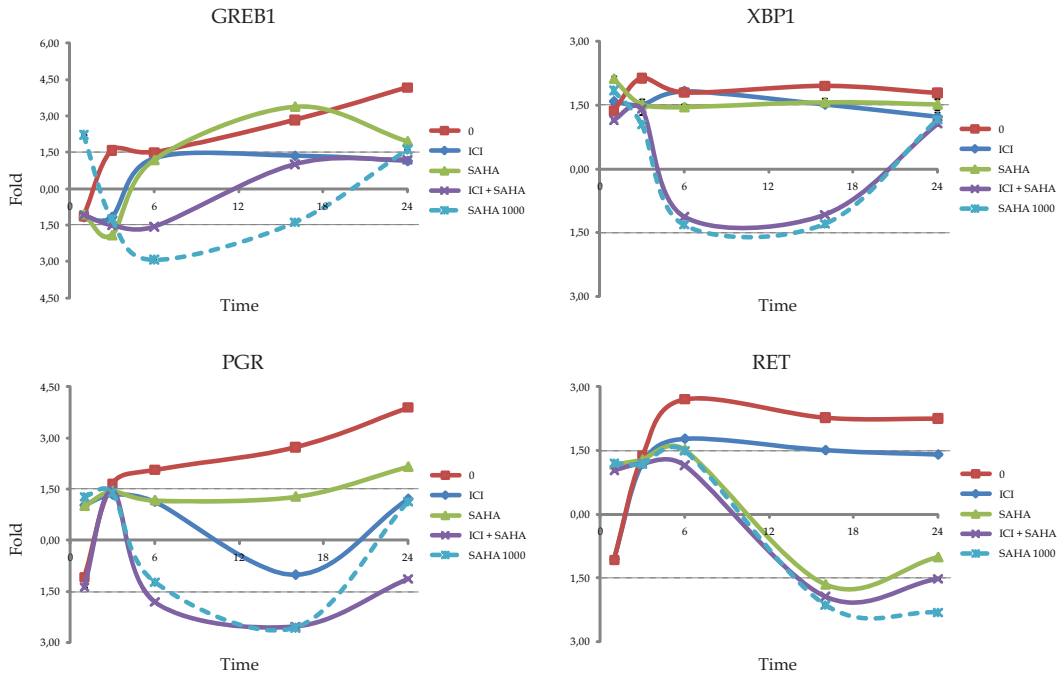


C.

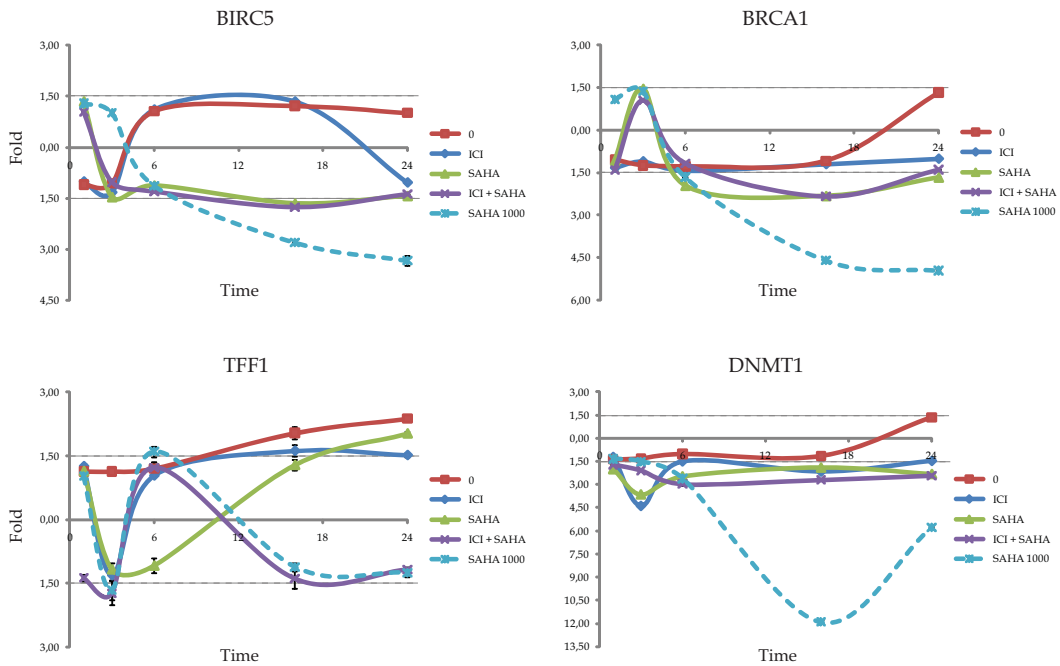


# Figure 8

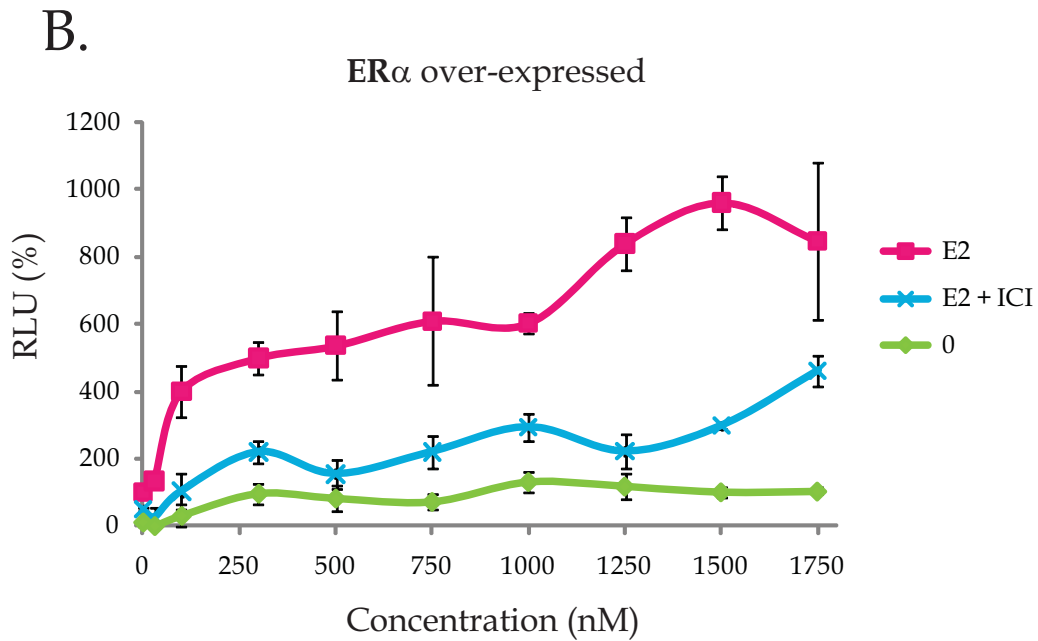
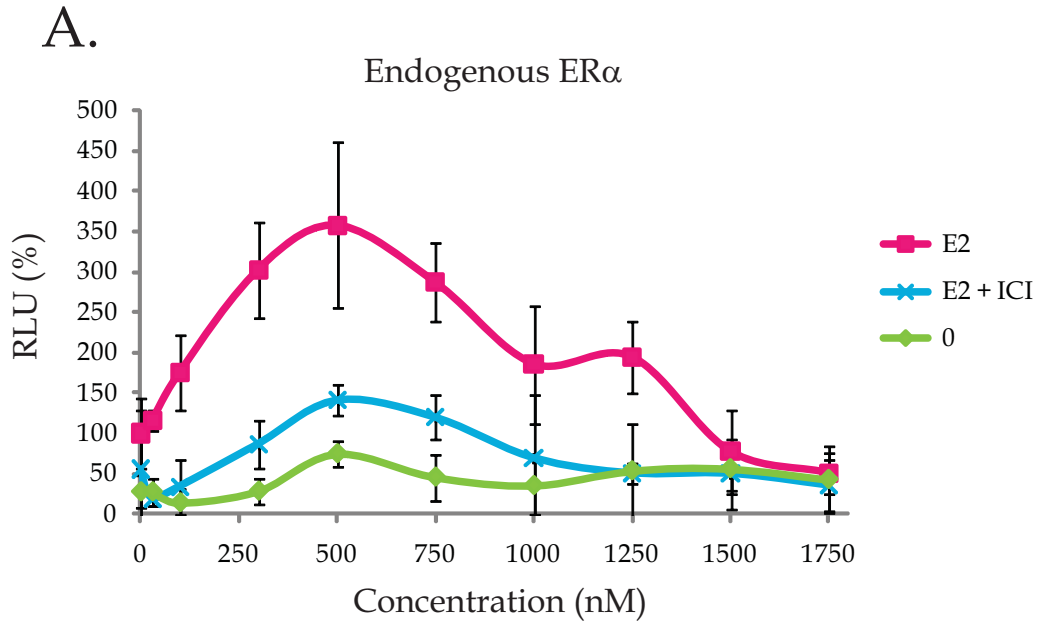
## A. Primary E2-target genes



## B. Secondary E2-target genes

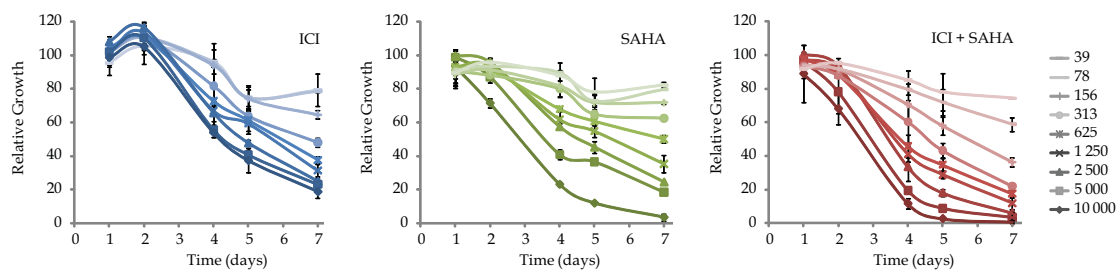


# Figure 9

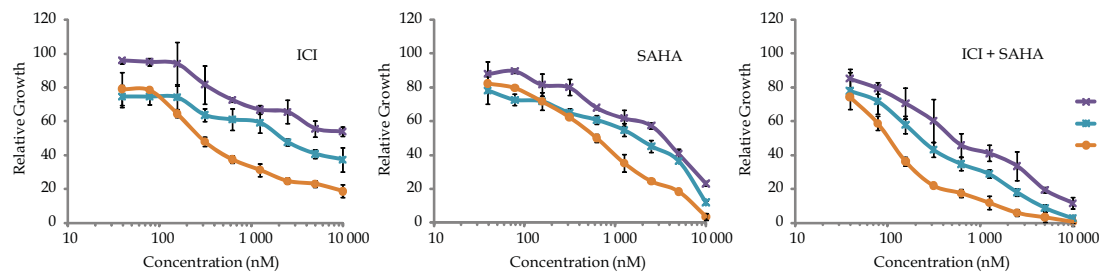


# Supplementary Figure 1

A.

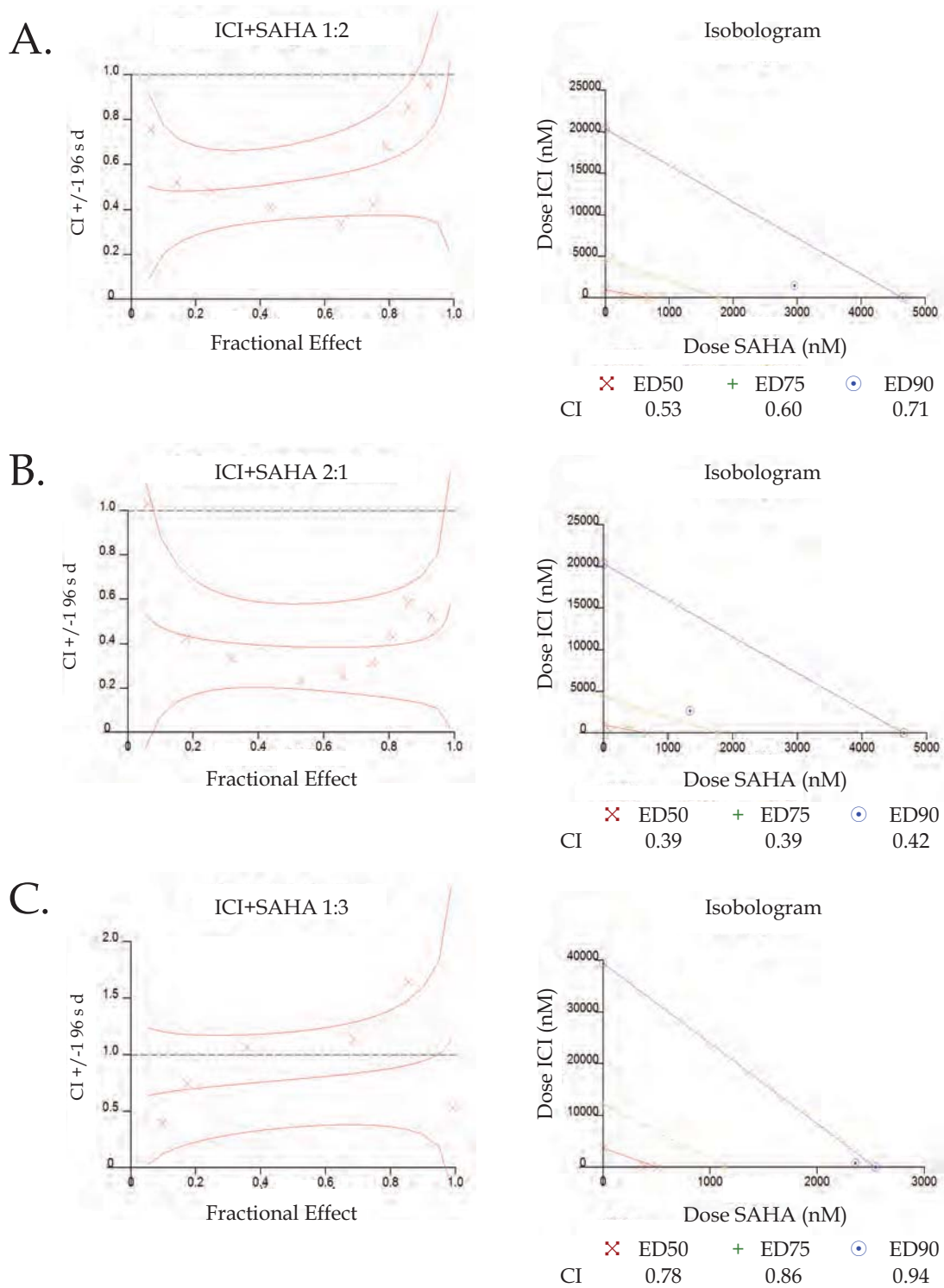


B.

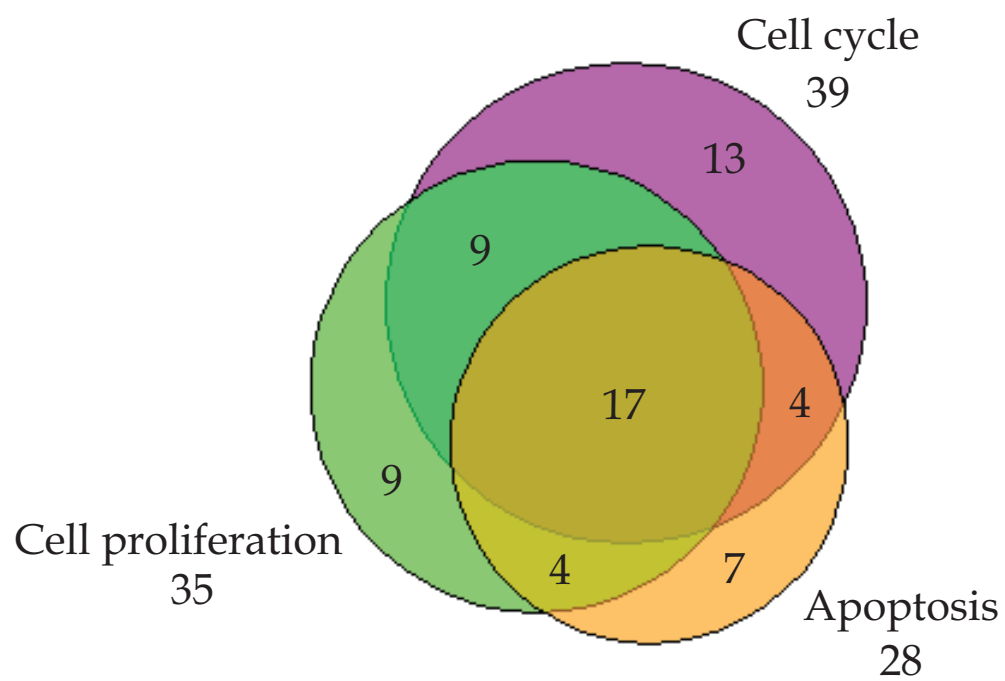




# Supplementary Figure 2



# Supplementary Figure 3



## REFERENCES

- Alao, J. P., et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines." *Clinical Cancer Research* **10**(23): 8094-8104.
- Anzai, Y., et al. (1989). "Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line)." *Cancer Res* **49**(9): 2362-2365.
- Anzano, M. A., et al. (1994). "Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen." *Cancer Res* **54**(17): 4614-4617.
- Barsalou, A., et al. (2002). "Growth-stimulatory and transcriptional activation properties of raloxifene in human endometrial Ishikawa cells." *Mol Cell Endocrinol* **190**(1-2): 65-73.
- Batty, N., et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents." *Cancer Lett* **280**(2): 192-200.
- Benjamini, Y., et al. (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* **57**(1): 289-300.
- Benz, C., et al. (1983). "Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism in vitro." *Cancer Res* **43**(11): 5298-5303.
- Bicaku, E., et al. (2008). "Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling." *Cancer Res* **68**(5): 1513-1519.
- Blumenschein, G. R., Jr., et al. (2008). "Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer." *Investigational New Drugs* **26**(1): 81-87.
- Bolden, J. E., et al. (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nature Reviews. Drug Discovery* **5**(9): 769-784.
- Bourdeau, V., et al. (2008). "Mechanisms of primary and secondary estrogen target gene regulation in breast cancer cells." *Nucleic Acids Res* **36**(1): 76-93.
- Carroll, J. S., et al. (2006). "Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites." *Nat Genet* **38**(11): 1289-1297.
- Chou, T. C., et al. (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.

- Comité directeur de la Société canadienne du cancer (2010). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*. Toronto, Canada, Société canadienne du cancer.
- Dauvois, S., et al. (1993). "The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling." *Journal of Cell Science* **106 ( Pt 4)**: 1377-1388.
- Du, P., et al. (2008). "lumi: a pipeline for processing Illumina microarray." *Bioinformatics* **24(13)**: 1547-1548.
- Duvic, M., et al. (2007). "Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)." *Blood* **109(1)**: 31-39.
- Fan, J., et al. (2008). "ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor." *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **134(8)**: 883-890.
- Finnin, M. S., et al. (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." *Nature* **401(6749)**: 188-193.
- Fisher, B., et al. (1994). "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14." *J Natl Cancer Inst* **86(7)**: 527-537.
- Fiskus, W., et al. (2007). "Hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitors attenuate estrogen receptor-alpha levels and transcriptional activity: a result of hyperacetylation and inhibition of chaperone function of heat shock protein 90." *Clinical Cancer Research* **13(16)**: 4882-4890.
- Frijters, R., et al. (2008). "CoPub: a literature-based keyword enrichment tool for microarray data analysis." *Nucleic Acids Res* **36(Web Server issue)**: W406-410.
- Glaser, K. B., et al. (2003). "Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines." *Mol Cancer Ther* **2(2)**: 151-163.
- Grewal, S. I., et al. (2003). "Heterochromatin and epigenetic control of gene expression." *Science* **301(5634)**: 798-802.
- Health, U. S. N. I. o. (2010). "Clinical Trials." Retrieved august, 2010, from <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>.
- Hirokawa, Y., et al. (2005). "Signal therapy of breast cancers by the HDAC inhibitor FK228 that blocks the activation of PAK1 and abrogates the tamoxifen-resistance." *Cancer Biol Ther* **4(9)**: 956-960.
- Howell, A., et al. (1995). "Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer." *Lancet* **345(8941)**: 29-30.

- Jang, E. R., et al. (2004). "The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen." *Oncogene* **23**(9): 1724-1736.
- Johnstone, R. W., et al. (2003). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target?" *Cancer Cell* **4**(1): 13-18.
- Kelly, W. K., et al. (2005). "Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid." *Nat Clin Pract Oncol* **2**(3): 150-157.
- Kelly, W. K., et al. (2003). "Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously." *Clin Cancer Res* **9**(10 Pt 1): 3578-3588.
- Kestler, H. A., et al. (2005). "Generalized Venn diagrams: a new method of visualizing complex genetic set relations." *Bioinformatics* **21**(8): 1592-1595.
- Kim, M. S., et al. (2003). "Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA." *Cancer Res* **63**(21): 7291-7300.
- Kim, M. Y., et al. (2006). "Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor." *Mol Endocrinol* **20**(7): 1479-1493.
- Kim, S. H., et al. (2010). "Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein." *Breast Cancer Res* **12**(2): R22.
- Luu, T. H., et al. (2008). "A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study." *Clinical Cancer Research* **14**(21): 7138-7142.
- Mann, B. S., et al. (2007). "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." *Oncologist* **12**(10): 1247-1252.
- Marchion, D., et al. (2007). "Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment." *Expert Review of Anticancer Therapy* **7**(4): 583-598.
- Margueron, R., et al. (2004). "Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens." *J Mol Endocrinol* **32**(2): 583-594.
- Margueron, R., et al. (2004). "Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells." *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1239-1246.
- Marks, P. A. (2007). "Discovery and development of SAHA as an anticancer agent." *Oncogene* **26**(9): 1351-1356.
- Marks, P. A., et al. (2007). "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." *Nature Biotechnology* **25**(1): 84-90.

- Martin, C., et al. (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(11): 838-849.
- Mitsiades, C. S., et al. (2004). "Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(2): 540-545.
- Modesitt, S. C., et al. (2008). "A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study." *Gynecologic Oncology* **109**(2): 182-186.
- Munster, P. N., et al. (2001). "The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells." *Cancer Res* **61**(23): 8492-8497.
- Nguyen, D., et al. (2001). "A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome." *Mol Endocrinol* **15**(10): 1790-1802.
- O'Lone, R., et al. (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." *Mol Endocrinol* **18**(8): 1859-1875.
- Osborne, C. K., et al. (1995). "Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer." *Journal of the National Cancer Institute (1988)* **87**(10): 746-750.
- Parker, M. G. (1993). "Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action." *Breast Cancer Research and Treatment* **26**(2): 131-137.
- R Development Core Team (2008). *R: A language and environment for statistical computing*. R. F. f. S. Computing. Vienna.
- Reid, G., et al. (2005). "Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A." *Oncogene* **24**(31): 4894-4907.
- Rocha, W., et al. (2005). "Opposite effects of histone deacetylase inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells." *Molecular Pharmacology* **68**(6): 1852-1862.
- Sibonga, J. D., et al. (1998). "Effect of the high-affinity estrogen receptor ligand ICI 182,780 on the rat tibia." *Endocrinology* **139**(9): 3736-3742.
- Simpson, E., et al. (2000). "The role of local estrogen biosynthesis in males and females." *Trends Endocrinol Metab* **11**(5): 184-188.
- Singh, T. R., et al. (2005). "HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma." *Oncogene* **24**(29): 4609-4623.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**: Article3.

- Smyth, G. K. (2005). *Limma: linear models for microarray data*. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. V. C. R. Gentleman, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber. New York, Springer: 397-420.
- Thomas, S., et al. (2009). "Histone deacetylase inhibitor induced modulation of anti-estrogen therapy." *Cancer Lett.*
- van Leeuwen, F. E., et al. (1994). "Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer." *Lancet* **343**(8895): 448-452.
- Vansteenkiste, J., et al. (2008). "Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer." *Investigational New Drugs* **26**(5): 483-488.
- Wakeling, A. E. (1995). "Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens." *Biochemical Pharmacology* **49**(11): 1545-1549.
- Wakeling, A. E., et al. (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." *Cancer Research* **51**(15): 3867-3873.
- Wang, C., et al. (2001). "Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity." *Journal of Biological Chemistry* **276**(21): 18375-18383.
- Yi, X., et al. (2008). "Histone deacetylase inhibitor SAHA induces ERalpha degradation in breast cancer MCF-7 cells by CHIP-mediated ubiquitin pathway and inhibits survival signaling." *Biochemical Pharmacology* **75**(9): 1697-1705.





## **DISCUSSION**



De par son implication dans le cancer du sein, le récepteur des œstrogènes est une cible importante des thérapies anti-cancéreuses. Amplifié dans les 2/3 des tumeurs mammaires, il permet le traitement de ces dernières par thérapie anti-œstrogénique. Néanmoins, des traitements plus efficaces et plus confortables pour les patients n'en restent pas moins nécessaires et font partie des priorités des gouvernements en terme de financement de la recherche. Il est indispensable d'avoir la meilleure compréhension possible de son fonctionnement afin de pouvoir l'utiliser ou contrer, au mieux ses propriétés, à des fins thérapeutiques. Ainsi, de même que l'inhibition de son activité par les anti-estrogènes permet de traiter certains cancers, les mécanismes de reconnaissance à l'ADN de ER $\alpha$  pourraient, un jour prochain, permettre d'utiliser les récepteurs hormonaux comme outils de thérapie génique.

## 1. SPÉCIFICITÉ DE LIAISON À L'ADN DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Les interactions entre les protéines et l'ADN sont essentielles à la vie. Elles reposent sur une régulation fine, afin d'assurer un couplage et une reconnaissance parfaite des éléments du complexe. La compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par les interactions spécifiques, entre récepteur nucléaire et ADN, est essentielle à la compréhension de la régulation de l'expression génique. Ainsi, les deux premières études de cette thèse ont pour but d'étudier la liaison de ER $\alpha$  aux EREs, qui constituent une étape cruciale aboutissant à la transcription des gènes cibles des œstrogènes. Afin de rencontrer ces objectifs, plusieurs questions ont été posées. Quel est l'impact de chaque déterminant de la liaison récepteur-ADN ? Ont-ils tous le même rôle ou chacun un rôle spécifique ? Mais également, comment s'explique la liaison des récepteurs stéroïdiens, comme le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ , à des motifs ADN qui varient par rapport au consensus ? Et finalement, les modèles bio-informatiques existants permettent-il de prédire les motifs ADN qui vont être liés ? Dans ce cas, serait-il possible de concevoir des récepteurs capables de lier un motif pré-déterminé, ce qui permettrait leur utilisation en thérapie génique ? Afin de répondre à ces questions, le rôle particulier des 4 acides aminés de ER $\alpha$ , impliqués dans les contacts directs avec l'ADN, ont été étudié par mutagenèse dirigée. Ceci a permis de mettre en évidence les impacts différents de chaque déterminant sur l'affinité et la spécificité de liaison de ER $\alpha$  à l'ADN. En particulier, le rôle du résidu R211, indispensable à la liaison du récepteur ER $\alpha$  à l'ADN, ne se limite pas seulement à ce dernier, mais semble bien s'étendre à toute la famille des récepteurs nucléaires au sein de différentes espèces. Également, l'interdépendance des acides aminés en position 203 et 206, en plus de ceux en position 203 et 210, et des bases de l'ADN liées, est également un concept mis en évidence dans ces études. Elles ont également permis de démontrer la possibilité d'obtenir de nouvelles spécificités de liaison à l'ADN, avec des mutants du ER $\alpha$  au niveau des résidus entrant en contact avec des bases de l'ADN. Cependant, ces nouvelles spécificités de liaison ou les

différents motifs pouvant être liée par les récepteurs mutants n'ont pas pu être prédit par les modèles bio-informatiques actuellement disponibles. De nouveaux outils bio-informatiques seraient donc nécessaires afin de pouvoir penser à générer des récepteurs hormonaux capables de lier des séquences d'intérêt pré-déterminer. Néanmoins la conception de tel modèles bio-informatiques prédictifs semblent très difficile du fait de la complexité de la liaison entre les récepteurs nucléaires et l'ADN.

### 1.1. RÔLE CRUCIAL DE R211 DANS LA LIAISON DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES À L'ADN

L'acide aminé R211, de l'hélice de reconnaissance à l'ADN de ER $\alpha$ , lie la base G+2 de l'ERE consensus. L'impact primordial de R211 dans la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN est mis en évidence par l'incapacité de tous les mutants à lier l'ADN, quels que soit la taille des chaînes latérales des acides aminés, leur charge, leur polarité... et quelque soit la base en position +2 (Article 2 - figure 4). La modélisation moléculaire du récepteur sauvage lié à l'ADN a permis de mettre en évidence, le fait que la chaîne latérale de R211 génère des interactions d'empilement (ou de packing) avec le sillon majeur de l'ADN et l'hélice de reconnaissance à l'ADN de ER $\alpha$  (Article 2 - figure 7). Egalement, en plus de la liaison de la base G+2, R211 forme une liaison avec le squelette Désoxyribose-phosphate au niveau de la base T+1. Cette observation corrèle avec des résultats d'études bio-informatiques. En effet, l'étude des IFIEs ou énergies d'interaction inter-fragments par calcul des FMO (Fragment Molecular Orbital) met en évidence un pic d'énergie entre R211 et le squelette d'ADN en position T+1 (Watanabe et al., 2007). Cette liaison fait également partie des plus fortes identifiées et quantifiées par le modèle bio-informatique HINT (hydrophobic interaction) (Marabotti et al., 2007). En plus de cette concordance de nos observations expérimentales avec notre modélisation moléculaire et les études bio-informatiques publiées, l'importance de R211 pour la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN corrèle avec sa parfaite conservation au sein de tous les récepteurs nucléaires

fonctionnels ou potentiels humains (48 récepteurs nucléaires), mais aussi de la mouche *d. melanogaster* (21) et du nématode *C. elegans*, malgré leur grand nombre et leur grande diversité (284) (Article 2 - figure 6). Étant donné sa parfaite conservation au cours de l'évolution, une **arginine à cette position est la seule possibilité permettant la liaison à l'ADN**. En effet, un mutant de ER $\beta$  à cette position (et en K210) : K174A-R175E, perd toute activité luciférase E2- et ERE-dépendante (Bjornstrom *et al.*, 2002). L'impact de la mutation de la lysine ne peut cependant pas être distingué de celui de l'arginine. Afin de mieux valider la conclusion selon laquelle la présence d'une arginine à cette position est indispensable à la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN, des mutants de différents récepteurs pourraient être générés par mutation dirigée, et leur liaison à l'ADN testé par gel shift, ou leur capacité de transactivation par essai luciférase.

L'arginine en position 211 de ER $\alpha$  semble indispensable, plus de par sa liaison avec le phosphate en T+1, que de par celle avec la base G+2. Appuyant cette hypothèse, les modèles bio-informatiques, énoncés ci-dessus, attribuent entre 3 et 7 fois plus de force à la liaison entre R211 et le phosphate en T+1, qu'à celle avec la base G+2 (Marabotti *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2007). Cette hypothèse se vérifie également de manière expérimentale puisqu'une faible liaison est observable entre ER $\alpha$  et un ERE imparfait, comportant un A en position +2 dans les deux motifs du palindrome (Article 1 - figure 3 et Article 2 - figure 2). Selon les règles chimiques d'attraction de charges, les motifs contenant un T en position +2 auraient du être liés, ce n'est pourtant pas le cas. Ceci résulte d'un conflit stérique entre la chaîne latérale de l'arginine et le groupe méthyle de la thymine. Il est intéressant de noter qu'une lysine à cette position (R211K) ne fait pas face à ce conflit stérique, pourtant elle ne permet pas non plus de liaison à l'ADN, car elle ne reproduit pas les propriétés d'empilement de R211. Finalement, la matrice de poids, réalisées à partir de 76 EREs naturels liés par ER $\alpha$ , met en évidence que la base en position +2 est la plus conservée du motif; cependant, elle montre également que des EREs imparfaits comportant des bases différentes à cette position peuvent être liés (Article 2 - figure 2). De tels exemples existent effectivement parmi les gènes cibles des œstrogènes :

les gènes humains ADORA1 ou SCNN1A comportent des EREs imparfaits avec un mésappariement en position +/-2 : leurs EREs sont AGGTtA GGG TGACCT et AGGTCA GCC TcACCC, respectivement (Bourdeau *et al.*, 2004). Le gène TGFA est lui aussi lié par ER $\alpha$  alors que les bases en +/-2 sont imparfaites dans les deux motifs du palindrome : AGGTgA CGG TagCCg. De par ces modifications, il se pourrait que l'expression de ces gènes nécessite la présence, au sein de leur promoteur, d'autres EREs, demi-EREs ou sites de liaison d'autres facteurs de transcription (tel que AP-1) qui pourraient créer une synergie avec l'ERE imparfait et permettre une transcription efficace. L'étude des promoteurs de ces gènes et d'autres qui restent à identifier, pourrait permettre une meilleure compréhension de l'aspect indispensable de R211 dans la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN, ainsi que de l'impact d'une autre base en position +/-2 des EREs en conditions naturelles, mais aussi leur coopération avec d'autres éléments des promoteurs.

## 1.2. CONSERVATION ET INTERDÉPENDANCE DE CERTAINS ACIDES AMINÉS DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES INTRA- ET INTER-ESPÈCES

L'étude de la conservation des quatre acides aminés impliqués dans la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN a, tel que mentionné ci-dessus, établie la complète conservation de l'arginine en position 211 au sein des 284 récepteurs nucléaires de *C. elegans*, des 21 membres de la famille chez *d. melanogaster* et des 48 récepteurs humains (Article 2 figure 6). Après R211, K210 la lysine en position 210 de ER $\alpha$  est la plus conservée au sein des récepteurs nucléaires (Tableau VIII). Que ce soit chez *H. sapiens*, *D. melanogaster* ou *C. elegans*, les récepteurs nucléaires comprennent quasiment tous un acide aminé chargé positivement à cette position, soit 100%, 92% et 97% des récepteurs nucléaires, respectivement. L'étude de conservation des acides aminés a également permis de mettre en évidence l'interdépendance des acides aminés en position 203 et 206. Si l'interdépendance des acides aminés en position 203 et 210 de

*Tableau VIII - Fréquences des acides aminés majoritaires aux positions 203, 206 et 210 chez H. sapiens, D. melanogaster et C. elegans.*

Acides aminés	<u>Position 210</u>		
	H. sapiens	D. malanogaster	C. elegans
Négatifs (E/D)	0	0	0
Positifs ( <u>K</u> /R)	<b>100%</b>	<b>92%</b>	<b>97%</b>
Non chargés	0	8% (G)	3% (H, G, S, A, F, Y, W, T)

Acides aminés	<u>Position 203</u>		
	H. sapiens	D. malanogaster	C. elegans
Négatifs ( <u>E</u> /D)	<b>87%</b>	<b>97%</b>	10%
Positifs (K/R)	0	0	40%
Non chargés	13% (G, N)	3% (N)	<b>50%</b>

Acides aminés	<u>Position 206</u>		
	H. sapiens	D. malanogaster	C. elegans
Positifs <u>K</u>	<b>98%</b>	<b>88%</b>	40%
R	0	0	NS (1 récepteur)
Négatifs D	0	0	NS (1 récepteur)
Non chargés A	0	2%	<b>45%</b>
S	2%	10%	6%
Autres	0	0	9% (T, I, N, L, C, G)



ERa ne fait pas de doute puisque lie les mêmes paires de bases sur les brins opposés de l'ADN, il n'en est pas moins étonnant que E203 et K206 soient également interdépendants.

Les acides aminés aux positions 203 et 206 présentent plus de variations au cours de l'évolution. En effet, la lysine en position 206 est très conservée chez l'Homme (98% de récepteurs nucléaires comportent une lysine à cette position), moins chez *D. melanogaster* (88%) et encore moins chez *C. elegans* avec 40% de lysine en 206 au profit de l'alanine dans 45% des cas (Tableau VIII). Il semblerait donc que la lysine soit du plus en plus conservée au sein des récepteurs nucléaires au cours de l'évolution. Par contre, aucun récepteurs nucléaires ne possèdent d'acide aminé chargé négativement à cette position (sauf un récepteur de *C. elegans*, qui constitue « l'exception qui confirme la règle »). De la même manière, les acides aminés en position 203 des récepteurs nucléaires de l'Homme et de *D. melanogaster* ne comportent jamais d'acides aminés chargés positivement, mais des acides aminés présentant des charges négatives dans 87% et 97% des cas, respectivement (Tableau VIII). Par contre, chez *C. elegans*, 40% des récepteurs contiennent un acide aminé chargé positivement à cette position, contre 10% chargé négativement.

Ainsi, même si ces acides aminés ne sont pas impliqués dans des contacts directs avec l'ADN dans tous les récepteurs nucléaires observés, de fortes tendances ressortent parmi les familles de récepteurs nucléaires au sein d'une même espèce, mais aussi entre différentes espèces. Chez l'Homme et *D. melanogaster*, les récepteurs nucléaires comportent des acides aminés chargés positivement aux positions 206, 210 et 211, et négativement en 203. Par contre, au sein de la famille des récepteurs de *C. elegans*, qui a subi une explosion en nombre et une diversification sans pareil, les acides aminés en 210 et 211 restent chargés positivement tandis ceux en position 203 et 206 sont, pour moitié, non chargés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'un grand nombre des récepteurs nucléaires de *C. elegans* dériveraient d'un gène ancestral de HNF4 (Robinson-Rechavi *et al.*, 2005). Cependant, les récepteurs HNF4 a et b humains présentent des acides aminés chargés positivement aux positions 206, 210 et 211, et un résidu négatif en 203, comme les

autres récepteurs nucléaires humains, ce qui ne concorderait pas avec l'hypothèse mentionnée ci-dessus.

Les fréquences observées mettent en évidence une relation d'opposition de charges entre les acides aminés en position 206 et 210 par rapport à celui en 203. En ce sens, la comparaison entre les fréquences théoriques (considérant l'indépendance des acides aminés, les uns par rapport aux autres) et celles observées (à partir des alignements de séquences des 292 récepteurs nucléaires humains définis ou potentiels) démontre que les acides aminés aux positions 203 et 206 ne sont pas indépendants. En effet, il y a une sur-représentation des acides aminés E203 et K206, par rapport aux autres : leur présence est observée dans 75% des récepteurs, alors que théoriquement ils ne devraient être présents que dans 66% des cas (Tableau IX).

Cette relation d'opposition de charge entre les acides aminés en position 203 et 206 est présente chez *H. sapiens* ainsi que chez *D. melanogaster*, dont les ces acides aminés comportent des charges opposées dans 79% et 86% des cas (respectivement). Par contre, la majorité des récepteurs de *C. elegans* comportent un seul résidu chargé parmi les 2 acides aminés en position 203 et 206 (Tableau X).

Parmi plus de 700 récepteurs nucléaires, potentiels ou définis, issus de 3 espèces, seuls 5 récepteurs de *C. elegans* (correspondant à 1% de ses récepteurs), présentent des acides aminés tout deux chargés positivement en 203 et 206. La liaison ou l'absence de liaison de ces récepteurs à l'ADN n'est pas connu pour le moment, ne permettant pas conclure sur l'impact de deux charges positives à ces positions. Néanmoins, l'absence quasi-parfaite de tels cas au sein des membres de la famille des récepteurs nucléaires laissent penser que de tels récepteurs ne seraient pas capables de lier l'ADN efficacement pour permettre la transcription de gènes. Néanmoins, il serait intéressant de déterminer si c'est effectivement le cas de ces 5 récepteurs. Des méthodes expérimentales récentes permettent de répondre à cette question rapidement. Elles testent la capacité de liaison d'un récepteur à de nombreux motifs d'ADN en une seule fois (Warren *et al.*, 2006). La présence d'un partenaire pourrait leur être nécessaire pour lier l'ADN. En effet, l'hétérodimérisation des récepteurs nucléaires a un impact sur leur liaison à l'ADN. Par exemple, les récepteurs RAR, RXR et TR lient des éléments de réponses différents et avec des affinités variables,

*Tableau IX: Fréquences théoriques, considérant les acides aminés aux positions 203 et 206 comme indépendants, et fréquences observées au sein des récepteurs nucléaires humains.*

Positions		Nombres	Fréquences		Charges
203	206	Observés	Observées	Théoriques	
<u>E</u>	<u>K</u>	<b>218</b>	<b>75%</b>	<b>66%</b>	<b>Opposées</b>
D	<u>K</u>	11	4%	<b>4%</b>	<b>Opposées</b>
G	<u>K</u>	29	10%	9%	-
D	S	3	1%	NS	-
N	S	2	1%	NS	-

*Tableau X: Comparaison des charges présentées par les acides aminés aux positions 203 et 206.*

Positions		Nombres	Charges	Fréquences
203	206			
Chargés -		229		87%
Chargés +		258		98%
<u>E/D</u>	<u>K</u>	229	<b>Opposées</b>	<b>87%</b>
Non chargés	<u>K</u>	29	1 charge	11%
Non chargés	Non chargés	5	Non chargés	2%

\* les récepteurs ne possédant pas les 2 bases 203 et 206 ou les 4Cys du doigt de zinc ont été ignorés.

Positions		Nombres	Charges	Fréquences
203	206			
Chargés -		36		97%
Chargés +		33		88%
<u>E/D</u>	<u>K</u>	32	<b>Opposées</b>	<b>86%</b>
<u>E/D</u>	S/A	4	1 charge	11%
Non chargés	Non chargés	1	Non chargés	3%

Positions		Nombres	Fréquences	Charges	Fréquences (récepteurs tot.)
203	206				
Chargés		183			50%
Chargés		142			41%
		33		<b>Opposées</b>	<b>9%</b>
		145		1 charge	79%
		5		Même sens	1%
<u>E/D</u>		37	<b>100%</b>		
<u>E/D</u>	<u>K</u>	33	89%	Opposées	
<u>E/D</u>	A/S	4	11%	-	
<b>K/R</b>		<b>146</b>	<b>100%</b>		
K/R	<u>K</u>	5	3%	Même sens	
K/R	A	125	86%	-	
K/R	S	5	3%	-	
K/R	T, N, G	11	8%	-	

lorsqu'ils sont sous forme homodimérique ou hétérodimérique avec RXR (Mader *et al.*, 1993). Finalement, toujours afin de valider l'importance de l'opposition des charges des acides aminés en 203 et 206, des double-mutants de ER $\alpha$  (par exemple) comportant des acides aminés de même charges aux positions 203 et 206 (EK203/206KK ou EE) pourraient être générés et leur liaison à l'ADN testée, tout comme leur capacité de transactivation. De plus la modélisation moléculaire de ces mutants pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de tel changement sur les interactions entre les acides aminés et l'ADN.

Les mutants simples de E203 et K206 nous renseignent déjà sur l'importance de ces deux charges l'une par rapport à l'autre. La suppression de l'une des deux charges (ainsi que de l'encombrement stérique associé à la chaîne latérale du résidu) augmente la transcription sous contrôle d'EREs consensus, par contre l'affinité *in vitro* diminue (article 1 et article 2 figure 3). Ceci met en évidence l'aspect négatif de ces deux acides aminés sur la transcription. Ce dernier est probablement dû à l'encombrement stérique généré par leur chaîne latérale. Mais surtout cela montre que les deux charges ne sont pas indispensables, une seule permet de conserver les récepteurs transcriptionnellement actifs. Par contre la suppression des deux charges ne permet plus aux récepteurs de conserver leurs propriétés (article 2 figure 3, mutant E203A-K206A)

### 1.3. GENÈSE DE NOUVELLES SPÉCIFICITÉS DE LIAISON

#### 1.3.1. DUPLICITÉ DES RÔLES DE K206 : DES MUTANTS OSCILLANT ENTRE RELÂCHEMENT ET NOUVELLE SPÉCIFICITÉ DE LIAISON

Attestant de son importance dans la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN, l'acide aminé K206 est conservé dans 98% des récepteurs nucléaires humains et dans 88% de ceux de *D. melanogaster* (Tableau VIII). Au sein des récepteurs de *C. elegans*, les acides aminés en 206 sont toujours chargés positivement, à une exception près. Dans cette

même optique, il n'existe pas de mutants naturels de ER $\alpha$  ou ER $\beta$  en position 206. Par contre, les récepteurs AR et VDR peuvent comporter des mutations aux positions correspondantes. La mutation de AR K580R est associée à un défaut de la réponse aux androgènes (Gottlieb *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2001). La mutation K45E de VDR corrèle avec une forme héréditaire de rachitisme vitamino-dépendant (Kahlen *et al.*, 1997). Ces mutants naturels illustrent l'importance de K206 pour les mécanismes physiologiques et physiopathologiques de différents récepteurs nucléaires.

Dans le cas de ER $\alpha$ , K206 est impliqué dans un contact direct avec la base G-5 de l'EREcs. L'attraction des charges positives de K206 et négatives de G-5, présentées dans le sillon majeur de l'ADN, compensent pour l'encombrement stérique crée par la chaîne latérale de K206 et permet la création d'une liaison spécifique (article 2). La lysine en 206, est capable de lier la base G-5 de l'ERE consensus, mais aussi un T à cette position, mais avec une affinité moindre. Ceci peut s'expliquer par l'exposition de 2 charges négatives dans le sillon majeur de l'ADN en présence d'une guanine, tandis que la thymine n'expose qu'une seule charge et provoque des contraintes stériques plus importantes, du fait de la présence du groupe méthyle. Ainsi les EREs comprenant un T en position -5 engendrent une attraction des charges moindre et un encombrement stérique supérieur, d'où une affinité de liaison plus faible (Article 2 figure 2A). Les autres bases possibles en position -5 de l'ERE ne permettent pas la liaison de ER $\alpha$ , probablement parce que les charges qu'elles présentent dans le sillon majeur de l'ADN ne permettent pas de compenser pour l'encombrement stérique généré par la large chaîne latérale de K206. Néanmoins, ces observations restent à vérifier par modélisation moléculaire.

La présence d'une arginine à la place de la lysine en position 206 (K206R), engendre un encombrement stérique supérieur, néanmoins le mutant conserve la liaison avec l'ERE consensus G+2. Par contre, l'attraction des charges entre l'arginine et la base T-5 ne permet plus de compenser l'encombrement stérique généré par la chaîne latérale de l'arginine et le groupe méthyle de la thymine. Les résultats de liaison et de transactivation des mutants de ER $\alpha$  comportant des petits acides aminés en position 206 supportent l'hypothèse selon laquelle l'encombrement stérique et les

charges de K206 et de la base G-5 définissent la spécificité de liaison à l'ADN à cette position. Ces mutants (K206A, G, S ou C) ne provoquant plus de contraintes stériques, ne nécessitent plus la présence de charges pour compenser. Alors, quelle que soit la base à la position -5 de l'ERE, ces mutants de ER $\alpha$  lie l'ADN. La spécificité de liaison pour la base -5 de l'ERE est perdue. La modélisation moléculaire de ces liaisons devrait permettre de valider nos hypothèses expliquant ce relâchement de spécificité. D'une façon qui peut paraître étonnante, l'affinité de liaison *in vitro* (gel shift) de ces « petits » mutants est moindre, tandis que leur capacité à transactiver un gène rapporteur luciférase est supérieure, par rapport au récepteur sauvage (Article 2 figure 5). Néanmoins, il n'existe pas de relation linéaire entre la liaison *in vitro* (gel shift) et la transactivation induite par E2 d'un gène rapporteur *in vivo* (essai luciférase). Ceci a déjà été observé et étayé dans d'autres publications. Il n'existe de corrélation entre la liaison *in vitro* et la transcription *in vivo* que pour les EREs naturels, pas pour les EREs synthétiques (Klinge, 2001; Kulakosky *et al.*, 2002; Nardulli *et al.*, 1996). Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ces phénomènes : (i) la synergie existant entre les différents facteurs de transcription *in vivo*, (ii) la présence de facteurs cellule-spécifiques *in vivo*, tels que des co-activateurs, co-represseurs, facteurs de transcription, protéines adaptatrice, *etc.*, (iii) la distance entre l'ERE et le TSS, (iv) les modifications post-traductionnelles de ER $\alpha$  et/ou autres protéines, telles que la phosphorylation ou l'acétylation, (v) l'altération de l'architecture chromatinienne protéine- et séquence-spécifique (Klinge, 2001). Contrairement à l'augmentation de la transcription observée avec le mutant K206A, l'équipe de P.J. Kushner observe une transactivation ERE-dépendante faiblement réduite ou similaire au récepteur sauvage (Uht *et al.*, 2004). Cette différence provient probablement des quantités de récepteurs transfectés et des concentrations d'œstrogènes utilisées, beaucoup plus élevées dans leurs conditions. Néanmoins, une souris exprimant ER $\alpha$  K206A a été générée et présente une hyperprolifération des tissus ciblés qui corrèle, plus tard, avec le développement de tumeurs. Ces résultats concordent avec l'augmentation de la transcription ERE-dépendante que nous observons en présence du mutant K206A. Cette augmentation

de transcription par les petits acides aminés par rapport au récepteur sauvage contenant une lysine en position 206, laisse penser que cette dernière pourrait être impliqué dans la liaison d'un co-répresseur. Ainsi, en son absence, l'interaction avec le co-répresseur ne se fait pas et la transactivation ERE-dépendante est supérieure. Des expériences d'immunoprécipitation réalisées avec le récepteur sauvage et un ou plusieurs petits mutants de K206, pourraient permettre d'identifier les partenaires différentiellement recrutés. L'hypothèse impliquant un co-répresseur est appuyée par l'implication de K206 dans l'activation de la transcription des gènes cibles de AP-1. Cela a lieu selon un mécanisme commun à d'autres récepteurs nucléaires et implique possiblement un co-répresseur se liant au niveau de K206 (Uht *et al.*, 2004). Cette lysine pourrait également subir des modifications post-traductionnelles qui réduirait la transactivation ou modulerait l'affinité de liaison d'un co-facteur. K206 ne serait pas acétylée (Wang *et al.*, 2001), par contre sa phosphorylation pourrait être en cause. Finalement, la modélisation moléculaire devrait nous permettre de savoir si les petits acides aminés en position 206 interagissent avec la base en -5 de l'ERE. LE relâchement de la spécificité laisse plutôt penser le contraire. Il serait également intéressant de noter l'impact d'une telle substitution sur la liaison des acides aminés et des bases environnantes. En effet, l'absence de contact entre le petit acide aminé en 206 serait compensée par les autres liaisons.

Une nouvelle spécificité de liaison avec une activité transcriptionnelle faible, soit 15% de l'activité de ER $\alpha$  sur EREcs est néanmoins obtenue avec le mutant K206V. Il va lier spécifiquement et uniquement un ERE comportant un T en position -5. La modélisation moléculaire permettra d'expliquer les déterminants de cette interaction. De tels EREs imparfaits existent *in vivo*, par exemple, les promoteurs des gènes humains RARA et Prl1 comportent les EREs suivants : GtGTCA CCG TGACCC et ttGTCA CTA TGTCCt, respectivement (Bourdeau *et al.*, 2004). Ainsi, il pourrait être intéressant de vérifier que le mutant K206V est capable d'activer la transcription œstrogène-dépendante de ces gènes endogènes dans des cellules HeLa n'exprimant pas le récepteur ER $\alpha$  sauvage. L'expression de ces gènes pourrait être suivit par qPCR à l'aide d'amorces spécifiques.



Conformément à l'absence d'acides aminés négatifs à la position 206 au sein des récepteurs nucléaires des différentes espèces observées, les mutants présentant de tels acides aminés ne sont pas capables de lier l'ADN, quelle que soit la base en position -5. Ceci corrèle également avec l'interdépendance avec opposition de charge des acides aminés aux positions 203 et 206. Néanmoins, s'appuyant sur ces propriétés d'interdépendance, des doubles mutants : K206 E ou D (acides aminés négatifs) et E203A (inactivation de l'acide glutamique par mutation en alanine) pourraient lier l'ADN, peut-être même avec une nouvelle spécificité de liaison. Les doubles mutants avec inversion des charges entre E203 et K206 pourraient être testés, mais ne devraient pas être capable de lier l'ADN du fait de la lysine K210. Avant de réaliser ces expériences, leurs résultats pourraient être prédit par modélisation moléculaire.

La restriction des acides aminés en position 206 est notable au cours de l'évolution. En effet, parmi les récepteurs nucléaires de *C. elegans*, 91% comportent une alanine (A), une sérine (S) ou une lysine (K), tandis que 88% et 98% des récepteurs nucléaires de *D. melanogaster* et *H. sapiens* (respectivement) présentent une lysine à cette position. L'évolution semble donc s'être accompagnée d'une augmentation de la spécificité de liaison tout en diminuant le niveau de transactivation.

### 1.3.2. CAS COMPLEXE DE E203 ET K210 : INTERDÉPENDANCE ET NOUVELLE SPÉCIFICITÉ DE LIAISON

Le cas des acides aminée E203 et K210 est plus complexe car ils reconnaissent les mêmes 2 paires de bases centrales de l'ERE consensus GT -4/-3 sur les brins complémentaires de la double hélice d'ADN (Article 2 figure 2A). Comme dans le cas de K206 et G-5, la liaison des bases GT par le récepteur sauvage, correspond à un état d'équilibre entre encombrement stérique et attraction des charges, permettant la liaison spécifique à l'ADN. Ainsi, même si le récepteur sauvage est capable de lier les EREs comportant un motif avec des paires de bases centrales GG, l'affinité de liaison est plus faible. De tels EREs se retrouvent

néanmoins *in vivo*, par exemple, le promoteur du gène de l'utéroglobine de lapin comporte un ERE imparfait comportant les bases GG -4/-3 (Article 1 figure 1A).

Les acides aminés E203 et K210 de ER $\alpha$  créent chacun des contacts directs avec les bases centrales de l'ERE. D'après les résultats des articles 1 et 2, l'acide aminé K210 n'est pas indispensable à la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN puisque, l'inactivation de ce dernier dans le mutant K210A permet toujours la liaison à l'ADN et la transcription œstrogène-dépendante sous contrôle d'EREs (Article 2 figure 3). Ce n'est cependant pas le cas dans tous les autres récepteurs nucléaires. Par exemple, la lysine, correspondante à celle en position 210 de ER $\alpha$ , au sein du récepteur GR n'est pas impliquée dans l'interaction avec l'ADN (Hard *et al.*, 1990). Néanmoins, la conservation intra- et inter-espèce de ce résidu, de même que sa prise en compte dans le modèle de Suzuki *et al.* pour la prédiction de la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN, tendent à mettre en valeur son importance pour la liaison à l'ADN de nombreux récepteurs nucléaires (Suzuki *et al.*, 1994). Afin de valider cette hypothèse, des mutants d'autres récepteurs nucléaires humains ou d'autres espèces pourraient être générés, puis leur capacité de liaison et de transactivation étudiée (par gel shift et essai luciférase, respectivement).

L'acide glutamique en position 203 de ER $\alpha$  est, quant à lui, impliqué dans la liaison à l'ADN de nombreux récepteurs, par exemple pour les récepteurs de *C. elegans* : FAX-1 (orthologue de PNR) et NHR-67 (orthologue de TLX). Des mutations de cet acide aminé induisent des modifications dans leur liaison à l'ADN (DeMeo *et al.*, 2008). De même, la mutation du G577 du récepteur AR humain induit une diminution de la liaison à l'ADN et est impliqué dans le syndrome d'insensibilité aux androgènes (Nguyen *et al.*, 2001). Finalement la double mutation E168A-G168A dans le récepteur ER $\beta$  provoque une perte de la transcription E2-dépendante d'un gène rapporteur sous contrôle d'un ERE (Bjornstrom *et al.*, 2002). Cependant l'effet de la mutation d'un des deux acides aminés ne peut être distingué, ainsi la mutation de G168 pourrait tout aussi bien être responsable du phénotype observé. L'impact des mutations de E203 sur la transactivation des gènes induite par les récepteurs nucléaires atteste de son importance pour leur activité.

A niveau des acides aminés E203 et K210, une double mutation est nécessaire à l'obtention d'une nouvelle spécificité de liaison, du fait de leur interdépendance. En effet, le mutant E203R génère une nouvelle spécificité, seulement lorsque la lysine en position 210 est inactivée par mutation en alanine. Le mutant E203R-K210A lie et transactive de façon E2-dépendante un gène rapporteur sous le contrôle d'un ERE imparfait CT -4/-3 (Article 1 figure 7 et 8). La charge de l'acide aminé en position 210 doit être supprimée pour éviter un conflit de charge entre les deux résidus en question qui lient les mêmes paires de bases. La perte de la liaison de l'ERE consensus GT par le double mutant s'explique par l'encombrement stérique généré par la chaîne latérale de l'arginine en position 203 et la base G-4 (Article 1 figure 9).

### 1.3.3. DE L'INTERDÉPENDANCE DES ACIDES AMINÉS À LA THÉRAPIE GÉNIQUE VIA LA GENÈSE DE MUTANTS PRÉSENTANT DE NOUVELLES SPÉCIFICITÉS DE LIAISON

Ainsi, il est possible de générer des récepteurs nucléaires présentant de nouvelles spécificité de liaison à l'ADN par mutation d'un ou plusieurs acides aminés impliqués dans des contacts directs avec les bases des éléments de réponse. L'interdépendance de certains acides aminés entre eux, E203 et K210, mais aussi E203 et K206, explique dans le premier cas la nécessité d'une double mutation pour l'obtention d'une nouvelle spécificité de liaison ; dans le second cas, elle laisse supposer que des doubles mutants permettraient d'obtenir de nouvelles spécificités de liaison tout en conservant une activité transcriptionnelle convenable. La possibilité d'obtenir de nouvelle spécificité de liaison par mutation d'un ou 2 acides aminés d'un récepteur nucléaire laisse entrevoir leur possible utilisation en thérapie génique. De plus, leur utilisation permettrait de contrôler la localisation et la durée de l'activation de la transactivation par sa dépendance à un signal hormonal.

#### 1.4. LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES : DE FUTURS OUTILS POUR LA THÉRAPIE GÉNIQUE ?

Les récepteurs nucléaires pourraient constituer des outils fort intéressants pour la thérapie génique dans la mesure où des récepteur mutants seraient générés pour être capable de lier des séquences d'intérêt en réponse à une stimulation hormonale, par exemple. La mise en évidence du rôle de chacun des déterminants de la liaison de ER $\alpha$  à l'ADN, a permis une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacent à l'obtention de nouvelles spécificités de liaison. De plus ces études ont permis de démontrer la faisabilité de l'obtention de mutants présentant de nouvelles spécificités de liaison transcriptionnellement active : récepteurs ER $\alpha$  K206V, mais surtout E203R-K210A. Par contre l'acide aminé R211 doit rester intact pour permettre la liaison du récepteur à l'ADN.

D'autres récepteurs à doigts de zinc sont capables d'être modifiés de façon à lier des séquences ADN d'intérêt pré-définies. En effet, la mutation de quelques résidus clés pour la liaison à l'ADN, des récepteurs à deux doigts de zinc (C2H2) suffit à altérer leur spécificité de liaison. Les récepteurs artificiels sont composés de plusieurs doigts de zinc qui reconnaissent de nouvelles séquences d'ADN (Choo *et al.*, 1994; Jamieson *et al.*, 1994; Jamieson *et al.*, 2003; Rebar *et al.*, 1994; Wolfe *et al.*, 2000). Par exemple, une librairie de facteurs de transcription à doigts de zinc artificiels a été utilisée pour faire un screening fonctionnel de cellules tumorales peu invasives devenant très invasives. Ceci a permis l'identification de gènes impliqués dans le processus tumoral (Blancafort *et al.*, 2005). Une autre étude fait état de l'utilisation de récepteurs C2H2 fusionnés à un domaine nucléase pour le traitement du SCID par thérapie génique correctrice de gène (Urnov *et al.*, 2005). Pour le moment, les récepteurs nucléaires ne sont pas utilisables d'une telle manière. Pour ce faire, une connaissance accrue de leur mécanisme de liaison à l'ADN, ainsi que des modèles de prédiction des motifs ADN liés sont nécessaires. En complément de nos études, une meilleure compréhension du mode de liaison des récepteurs nucléaires pourrait être obtenue avec la technique de phage display. Une méthode similaire à

celle utilisée par Chusacultanachai, S. *et al.* permettrait de muter aléatoirement des récepteurs nucléaires puis de sélectionner ceux capables de lier l'ADN (Chusacultanachai *et al.*, 1999). Dans le cadre des récepteurs C2H2, cela a permis de générer des milliers de doigts de zinc, ainsi de découvrir les principes de reconnaissance de l'ADN par ces derniers (Beerli *et al.*, 2002; Pabo *et al.*, 2001; Rebar *et al.*, 1996; Wolfe *et al.*, 2000). Plus précisément, de nombreuses protéines à doigts de zinc comportant différentes séquences d'acides aminés comme hélice de reconnaissance à l'ADN ont été exprimées à la surface de bactériophages M13 filamenteux. Les phages qui liaient les séquences ADN d'intérêt ont été sélectionnés et après plusieurs tours d'amplification et de sélection, les ADN des clones individuels ont été séquencés pour révéler les résidus impliqués dans la reconnaissance à l'ADN. Par ce biais, un modèle de reconnaissance résumant les interactions entre les acides aminés et les bases a été généré. Ce dernier permet le design de protéines à doigts de zinc reconnaissant une séquence d'intérêt prédéterminée (Choo *et al.*, 1994). L'utilisation d'une méthode similaire devrait aussi permettre de vérifier l'implication d'acides aminés plus éloignés dans l'affinité de liaison à l'ADN. En effet, certains résidus de la queue C-terminale du DBD de ER $\alpha$  sont nécessaires à la liaison de l'ERE consensus (Mader *et al.*, 1993). De la même manière, la mutation de l'acide aminé R197 situé dans le domaine de localisation nucléaire (NLS), et non dans le DBD, du récepteur DAF-12 de *C. elegans*, provoque une perte de liaison à l'ADN tandis que la localisation nucléaire du récepteur est conservée (Shostak *et al.*, 2005). La recherche de différents motifs liés par les mutants intéressants pourra être faite par des méthodes telles que celles développées par Warren *et al.* Ils ont généré des puces comportant toutes les permutations possibles d'un duplex d'ADN afin de tester simultanément toutes les séquences qu'un récepteur peut lier (Warren *et al.*, 2006). Une autre méthode, basée des essais de ligation de proximité, pourrait également être utilisée (Gustafsdottir *et al.*, 2007). Ces deux méthodes permettront de tester à la fois, la spécificité et l'affinité de liaison. L'inverse pourrait également être réalisé : la banque de mutants pourrait être utilisée pour rechercher ceux capables de lier une séquence ADN d'intérêt à l'aide de « protein arrays » qui permettent de tester des centaines de protéines simultanément

(Ho *et al.*, 2006). Etant donné l'étonnante diversité de la famille des récepteurs nucléaires chez *C. elegans*, l'étude des motifs qu'ils lient pourrait aider à la compréhension des mécanismes de liaison des récepteurs nucléaires humains.

Il n'en reste pas moins qu'un modèle de prédiction des motifs ADN liés par une séquence d'acides aminés donnée est nécessaire à la genèse de récepteurs nucléaires capables de lier une séquence d'ADN spécifique. Cependant, de tels modèles ne sont pas encore disponibles.

### 1.5. DIFFICULTÉS LIÉES À L'UTILISATION DE MODÈLES BIO-INFORMATIQUES POUR PRÉDIRE LES SÉQUENCES ADN LIÉES PAR LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

L'utilisation des récepteurs nucléaires en thérapie génique repose sur l'émergence d'un modèle de prédiction efficace. Cependant, la genèse d'un tel modèle est difficile. Il existe deux types de modèles : qualitatifs ou quantitatifs. Les modèles qualitatifs sont les plus simples et listent les contacts observés entre les acides aminés et les bases. Ces contacts sont généralement spécifiques et dépendants de la position. Le complexe protéine-ADN est alors évalué selon le potentiel des interactions par rapport aux nombres de contacts valides que le modèle peut prédire (Choo *et al.*, 1994; Choo *et al.*, 1997; Greisman *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2001; Wolfe *et al.*, 1999). Le modèle quantitatif, quant à lui, assigne un score à chaque contact identifié et peut ainsi classer les cibles d'ADN (Benos *et al.*, 2002).

Les éléments de réponses des récepteurs stéroïdiens sont généralement composés de 2 ½ sites de 6 paires de bases arrangés en palindrome et séparés par quelques paires de bases. Ainsi, la discrimination des séquences consensus reposent sur très peu d'éléments. Les études cristallographiques de récepteurs stéroïdiens couplés à des séquences ADN consensus ou non-consensus ont confirmés que (i) seuls quelques résidus des récepteurs sont impliqués dans des contacts spécifiques avec l'ADN, (ii) les liaisons hydrogènes sont les principaux contributeurs à l'énergie

de liaison (Luisi *et al.*, 1991; Schwabe *et al.*, 1993; Schwabe *et al.*, 1995; Shaffer *et al.*, 2004). Malgré cette simplicité apparente, la genèse d'un code de reconnaissance à l'ADN des récepteurs nucléaires n'est toujours pas disponible.

Le code de reconnaissance publié par Suzuki *et al.* (Suzuki *et al.*, 1994) est un exemple de modèle quantitatif permettant de classer les liaisons entre les acides aminés et les bases en fonction de leur force. Cependant tel que nous l'avons démontré, ce modèle de prédiction n'est pas applicable à tous les récepteurs nucléaires puisqu'il ne permet pas de prédire efficacement les liaisons entre les récepteurs mutants de ER $\alpha$  et les motifs ADN, que ce soit dans le cas simple mettant en relation 1 acide aminé et une base (article 2) ou dans le cas plus complexe où deux acides aminés de ER $\alpha$  contactent les deux bases complémentaires de l'ADN (article 1). Finalement même après deux décennies de recherche, aucun modèle d'interaction n'est disponible pour prédire la liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.

Une phrase résume bien la difficulté d'obtenir un tel modèle : “Thus far, although there have been several attempts to elucidate protein DNA interaction through amino acid base recognition codes, sequence based profiles, or physical models of interaction, the greatest successes in engineering DNA binding specificity remain experimental.” (Raviscioni *et al.*, 2005). Elle souligne également le bien-fondé d'une approche par phage display.

En effet la mise en place des modèles actuels repose sur des simplifications qui semblent les rendre inadéquates lorsqu'ils sont testés expérimentalement. Par exemple, tous les modèles bio-informatiques présupposent que chaque base contribue indépendamment (les unes par rapport aux autres) à la liaison de la protéine à l'ADN. Ainsi l'énergie totale de l'interaction protéine-ADN correspond à la somme des énergies des contacts individuels (Benos *et al.*, 2002). Cette présomption d'additivité devient donc problématique si les bases de l'ADN ne sont pas indépendantes. Or nous avons établi que les bases +3 et +2 de l'ERE ne sont pas indépendantes (article 2). La complexité de la réalisation de tels modèles provient également du fait que de multiples facteurs physico-chimiques sont impliqués dans la spécificité de liaison. Ces derniers, en plus d'être particulièrement complexes, interagissent entre eux, ce

qui est difficile à reproduire par les méthodes bio-informatiques. De plus, plusieurs types d'interactions : électrostatiques, liens hydrogènes, interactions hydrophobes... sont impliqués dans la formation des complexes et doivent être prises en compte en même temps que des informations structurales résultants de la déformation de l'ADN, des interactions distance-dépendante entre différents intervenants et la contribution du solvant (Marabotti *et al.*, 2007). Il ne faut cependant pas perdre de vue que la genèse de tels modèles est possible puisqu'ils existent. Par exemple, ils sont utilisés pour la création de récepteurs C2H2 capable de lier une séquence d'intérêt (Jamieson *et al.*, 2003; Urnov *et al.*, 2005).

Deux modèles de prédiction, l'un quantitatif et l'autre qualitatif, ont été testés pour prédire la liaison du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  à l'ADN. Ni l'un ni l'autre ne permettent de prédire adéquatement la liaison aux éléments de réponse parfaits ou imparfaits de l'ADN (article 1 et 2 et data not shown).

Le modèle de Suzuki, mentionné ci-dessus, repose sur les structures cristallographiques des facteurs de transcription liés à l'ADN ainsi que sur des données biochimiques, génétiques et statistiques des interactions amino-acides/bases (Suzuki *et al.*, 1994). Ainsi, un « binding score » est attribué, il reflète la force de l'interaction entre une base et un acide aminé à une position donnée de l'hélice de reconnaissance à l'ADN. Cependant certaines simplifications ont du être utilisées pour la réalisation de ce modèle : (i) parmi les différents contacts possibles entre une protéine et une séquence ADN, seuls celui avec le score plus élevé a été conservé; (ii) un seul contact entre un résidu et une base a été considéré; (iii) finalement, dans le cas du récepteur ER $\alpha$ , tous les acides aminés impliqués dans la liaison à l'ADN n'ont pas été pris en compte. Ainsi, les contributions des acides aminés K206 et K210 ne sont pas considérées. Ces simplifications ne permettent pas aux modèles de refléter la complexité des liaisons entre les acides aminés de l'hélice de reconnaissance à l'ADN de ER $\alpha$  et les bases de l'ERE, et ainsi de prédire convenablement les interactions (article 1 et 2).

Un modèle bio-informatique plus récent et ayant pour but de prédire les sites de liaison de mutants de facteurs de transcription ne permet pas mon plus de prédire



efficacement la liaison des mutants de ER $\alpha$  à l'ADN (article 2 et data not shown). TFmodeller fonctionne à partir des informations contenues dans la « Protein Data Bank » et des interactions avec l'ADN de protéines dont les séquences présentent des homologies avec celle de la protéine testée (Contreras-Moreira *et al.*, 2007). Plus précisément, des complexes protéine-ADN homologues à celui testé vont être recherché dans la librairie des complexes par PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997). L'alignement de séquences ainsi produit servira à modéliser le complexe protéine-ADN, à moins qu'une structure protéine-ADN déjà cristallisée n'ai été fournie par l'utilisateur comme donnée de départ. Dans le cas de ER $\alpha$ , cette dernière option fut celle utilisée. Par la suite, les chaînes latérales d'acides aminés mutés sont ajoutées tout en conservant l'ADN en place, avec SCWRL (Canutescu *et al.*, 2003). Le programme calcule alors la probabilité de chaque contact modélisé, ainsi que les bases du motif ADN qui pourrait être modifiées du fait des mutations dans la protéine (Contreras-Moreira *et al.*, 2007).

La recherche d'un modèle bio-informatique permettant de prédire la séquence ADN liée par une protéine n'a donc pas encore aboutie à la genèse d'un code de reconnaissance. La prise en compte de la complexité de liaison entre récepteurs nucléaires et ADN est nécessaire à l'aboutissement d'un tel modèle.

## 2. ASSOCIATION DES ANTI-ŒSTROGÈNES ET DES INHIBITEURS DE HDACs POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS DU SEIN ER $\alpha$ -POSITIFS

Malgré de grandes avancées dans le domaine de la prévention et du traitement des cancers du sein, ces derniers demeurent la seconde cause de mortalité par cancer dans le monde occidental (U.S. National Institutes of Health, 2010). L'expression du récepteur des œstrogènes, ER $\alpha$ , dans les 2/3 des tumeurs mammaires, ainsi que leur dépendance envers les œstrogènes pour croître, permet l'utilisation d'anti-œstrogènes pour inhiber leur croissance. Néanmoins, la recherche de nouveaux traitements, plus efficaces et plus confortables pour les patientes se poursuit activement. Récemment, une nouvelle famille d'agents anti-tumoraux a émergé : les inhibiteurs des histones déacétylases (Martin *et al.*, 2005). Leur chef de file, SAHA, est actuellement utilisé pour le traitement des lymphomes cutanés des cellules T et testé, seul ou en combinaison, dans de nombreux essais cliniques pour tous types de cancers solides et hématologiques (Luu *et al.*, 2008; Mann *et al.*, 2007; Marks *et al.*, 2007). Les effets cytotoxiques de SAHA dirigés contre les cellules transformées sont très intéressants car les cellules normales restent viables en sa présence (Duvic *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 2003; Richon *et al.*, 2009). Cependant les patients présentant des tumeurs solides répondent faiblement à SAHA administré comme agent seul (Blumenschein *et al.*, 2008; Luu *et al.*, 2008; Modesitt *et al.*, 2008). Par contre, il semble avoir des effets très prometteurs en association avec d'autres agents anti-tumoraux, tels que l'acide rétinoïque ou le 5-fluoro-uracile (Anzano *et al.*, 1994; Benz *et al.*, 1983). Dans cet esprit, nous avons démontré que ICI et SAHA ont un effet synergique sur l'inhibition de la croissance des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives. Cette synergie résulte, au moins en partie, de la coopération des effets de ICI et SAHA sur la transcription des gènes cibles de E2 (article 3). Plus précisément, ICI mime la dégradation de ER $\alpha$  induite par les fortes doses de SAHA, permettant ainsi d'abaisser le seuil de concentration de SAHA nécessaire pour

réprimer la transcription ERE-dépendante. De la sorte, en présence de ICI de faibles doses de SAHA réduisent la transcription ERE-dépendante, alors que seules elles l'augmenteraient.

## 2.1. MÉCANISMES DES EFFETS SYNERGIQUES DE ICI ET SAHA SUR L'INHIBITION DE LA CROISSANCE DES CELLULES TUMORALES MAMMAIRES ER $\alpha$ -POSITIVES

Les effets de SAHA, sur la physiologie des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives MCF-7, ont été décrits par le groupe de V.M. Richon en 2001 (Munster *et al.*, 2001). SAHA, à des doses utilisables en clinique, bloque la croissance des cellules MCF-7, induit leur différenciation et provoque un peu d'apoptose. De plus, comme les autres membres de la famille des HDACis, SAHA induit la dégradation de ER $\alpha$ , via le protéasome, jusqu'à sa complète déplétion dans les cellules ER $\alpha$ -positives (Margueron *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008). Ils agissent également sur la transcription de ESR1, provoquant une diminution de son ARNm par des mécanismes directs ou indirects, selon les auteurs (Alao *et al.*, 2004; Ormandy *et al.*, 1992; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008). Finalement, en corrélation avec la réduction de la quantité de ER $\alpha$ , les HDACis diminuent l'expression des gènes cibles des œstrogènes, par des mécanismes directs et indirects qui seront discutés plus avant dans le paragraphe 2.1 (Jang *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008).

Au cours des années 1990, les effets de l'anti-œstrogène total ICI 182.780 sur la croissance des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives, ainsi que sur la voie de signalisation des œstrogènes, ont été démontrés. ICI inhibe la croissance des cellules MCF-7 (Wakeling *et al.*, 1991), en bloquant la signalisation des œstrogènes via la réduction des niveaux de récepteur ER $\alpha$  au niveau protéique (McClelland *et al.*, 1996; Osborne *et al.*, 1995; Wakeling, 1995), la déstabilisation de sa dimérisation (Dauvois *et al.*, 1993; Parker, 1993) et la diminution de son import dans le noyau

(Dauvois *et al.*, 1992). Plus récemment, il a été démontré que ICI induit une immobilisation rapide de ER $\alpha$  au sein du noyau (Htun *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2008; Stenoien *et al.*, 2000; Stenoien *et al.*, 2001). Finalement, Margueron *et al.* ont établi que les effets de ICI ne nécessitent pas d'activité HDAC, contrairement aux anti-œstrogènes partiels (Margueron *et al.*, 2004). Ainsi, SAHA ne devrait pas réduire ses effets. En ce sens, nos résultats montrent que les effets de ICI, tant au niveau de la répression de la croissance cellulaire, qu'au niveau de la réduction des quantités de récepteurs ER $\alpha$  ou de l'inhibition de la transcription ERE-dépendante en résultant, ne sont pas réprimés en présence de SAHA (article 3).

Afin de mettre en évidence la potentialisation des effets de ICI ou SAHA l'un par l'autre, des courbes de croissance dose-réponse en présence des composés seuls ou en combinaison, ont été réalisées dans différentes lignées de cellules tumorales mammaires. Les équations de Chou & Talalay ont été utilisées pour démontrer la synergie, à travers le calcul des valeurs d'index de combinaison (Chou *et al.*, 1984). Cette méthode est très fréquemment utilisée pour distinguer les phénomènes synergiques, additifs ou antagonistes entre eux, permettant à l'article décrivant ces équations d'être cités dans plus de 300 publications (U.S. National Institutes of Health, 2010). Les index de combinaison démontrent qu'ICI et SAHA synergisent pour inhiber la croissance des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives MCF-7 et ZR-75; par contre, l'ajout de ICI à SAHA ne permet pas d'augmenter l'impact de ce dernier, sur les cellules ER $\alpha$ -négatives MDA-MB-231 ou SK-BR-3 (article 3 - figure 1 et 2). Le maintien de la synergie, malgré l'utilisation de doses variant entre 30 et 5000nM, ou encore de temps de traitements allant de 4 à 7 jours et finalement de ratios différents, atteste de sa solidité (data not shown). Néanmoins, à partir de 7 jours de traitement, la synergie est moins stable. La combinaison de traitement avec des ratios équimolaire 1:1 (de chacune des drogues) apportent les index de combinaison les plus faibles. La mise en évidence de cette synergie d'inhibition de la croissance des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives soulève la question des mécanismes qui la sous-tendent.

### 2.1.1. MODULATION DE LA TRANSCRIPTION DES GÈNES CIBLES DES ŒSTROGÈNES ET CYCLE CELLULAIRE

Conformément à ses capacités d'inhibition des propriétés mitotiques des œstrogènes, ICI réprime l'entrée en phase S des cellules MCF-7, en induisant un blocage de la progression du cycle cellulaire en phase G1 (après 24h ou 48h de traitement en présence de E2) (article 3 - figure 3) (Watts *et al.*, 1995). Quant à lui, SAHA induit un blocage du cycle cellulaire ER $\alpha$ -dépendant en G1 (après 24h ou 48h de traitement) et un blocage ER $\alpha$ -indépendant en G2/M, surtout après 48h de traitement. Ces résultats concordent avec ceux publiés, selon lesquels tous les HDACis (excepté la tubacine) induisent un arrêt du cycle cellulaire en G1/S et plus rarement en G2/M (Gabrielli *et al.*, 2002; Johnstone, 2002; Marks *et al.*, 2001; Marks *et al.*, 2000). Finalement, nos résultats semblent mettre en évidence que les effets de ICI et SAHA s'additionnent pour bloquer plus efficacement le cycle cellulaire des MCF-7 en G1 et G2/M après 48h de co-traitement en présence de E2. Par contre, dans les cellules ER $\alpha$ -négatives, les effets de SAHA ne sont pas potentialisés par la présence de ICI.

L'addition des effets de ICI et SAHA sur le cycle cellulaire des MCF-7 corrèle avec la potentialisation de leurs effets sur la transcription des gènes cibles des œstrogènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, la répression de la transcription œstrogène-dépendante des gènes *CDC25A*, *CCND1*, *E2F2* et *E2F8* est supérieure en présence du co-traitement ICI et SAHA, par rapport aux drogues utilisées seules, en présence de E2 (article 3 - figure 4). Afin de valider ces résultats, leur répétition est nécessaire. Plus précisément, ICI et SAHA, comme traitements indépendants, démontrent une efficacité supérieure au co-traitement avant 6h; par contre après 6h le traitement combiné inhibe plus fortement l'expression des gènes susmentionnés. Ces effets résultent, au moins en partie, de la potentialisation de la dégradation de ER $\alpha$ , par le co-traitement (observée après 6h). Ils découlent, également de l'accroissement des effets répressifs de SAHA par ICI, ou inversement, sur la transcription de ces gènes. Un des mécanismes connus impliqué dans le blocage du cycle cellulaire par les HDACis repose sur l'inhibition de l'expression des

cyclines D et A. En effet, le traitement des cellules MCF-7 par TSA inhibe la transcription du gène *CCND1* par des mécanismes ER $\alpha$ -dépendant et ER $\alpha$ -indépendant (Alao *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005); TSA induit également la dégradation protéasome-dépendante de la cycline D1, provoquant un blocage du cycle cellulaire en G1 (Alao *et al.*, 2004). La diminution des niveaux cellulaires de cycline D contribue à la perte d'activité des kinases CDK2 et CDK4 et à l'hypo-phosphorylation de Rb, inhibant ainsi la progression du cycle cellulaire des phases G1 à S (Kim *et al.*, 1999; Qiu *et al.*, 2000; Sandor *et al.*, 2000). Ainsi, la potentialisation de l'inhibition de la transcription de *CCND1* en présence de ICI et SAHA (par rapport aux traitements seuls), participe fort probablement, à l'additivité de leurs effets sur la régulation du cycle cellulaire des MCF-7. Suivre la cinétique de dégradation de la cycline D1, en réponse aux traitements, seuls ou combinés, permettrait d'établir une nouvelle corrélation entre l'additivité des effets de ICI et SAHA sur le cycle cellulaire et le niveau d'expression de cette protéine. Afin d'illustrer son rôle dans ce phénomène, sa sur-expression ou sa déplétion par siRNA pourraient être envisagés. De la même manière, la répression de la transcription du gène de la cycline A2, *CCNA2*, est plus forte en présence du co-traitement. Ainsi la cycline A2 pourrait-elle aussi, impliquée dans l'additivité des effets de ICI et SAHA sur l'inhibition de la progression du cycle cellulaire des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives (data not shown).

L'autre mécanisme, fréquemment mis en avant pour expliquer l'arrêt du cycle cellulaire en G1 en réponse aux HDACis est l'induction, p53-indépendante, de l'expression du gène *CDKN1A* (codant pour la protéine p21), qui promeut, elle aussi l'hypo-phosphorylation de pRb (Gui *et al.*, 2004; Richon *et al.*, 2000; Vrana *et al.*, 1999). Cependant, nos résultats ne mettent pas en évidence d'augmentation de la transcription de ce gène (data not shown) (ces expériences restent à répéter) (Bolden *et al.*, 2006; Gui *et al.*, 2004). Contrairement aux apparences, ces résultats ne sont pas en contradiction avec ceux des autres équipes puisque les concentrations utilisées diffèrent grandement. L'augmentation de la transcription de p21 est observée en réponse à une concentration de SAHA 25 fois supérieure à celle que nous utilisons

(7500nM vs 300nM). Toutefois, cela atteste du fait que la dose de HDACi utilisée influe sur les effets observés. Nous avons fait le choix d'utiliser une faible concentration de SAHA correspondant à celles qui pourraient être utilisées en clinique. De plus, l'absence de régulation de ce gène par ICI et SAHA, comme agents seuls ou combinés, corrèle avec le fait qu'ils ne soient pas des gènes cibles des œstrogènes. En effets, seuls les gènes cibles des œstrogènes présentent une régulation par ICI et SAHA dans nos conditions (article 3 - figure 4 et 8). Cela illustre une certaine spécificité du traitement combiné ICI et SAHA. Les autres mécanismes pouvant également être mis en cause dans le blocage du cycle cellulaire entre les phases G1 et S, impliquent eux aussi des gènes non régulés par E2, et ont par conséquent peu de probabilité d'intervenir dans nos conditions.

Les mécanismes moléculaires sous-tendant le blocage du cycle cellulaire en G2/M ne sont pas encore élucidés. Une hypothèse avancée pour expliquer le blocage du cycle cellulaire en phase G2/M en réponse aux HDACis s'appuie sur l'hyperacétylation de l'hétérochromatine péricentrique et une perte de fonctionnement du point de contrôle résultant d'une ségrégation anormale des chromosomes ainsi que d'une fragmentation du noyau (Taddei *et al.*, 2005). Néanmoins, il a été démontré que les cellules tumorales ayant un point de contrôle défectueux en G2/M, commencent par s'accumuler en phase G2/M avant de passer ce point de contrôle pour entrer en apoptose (Peart *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2000; Ruefli *et al.*, 2001).

Ainsi, l'additivité des effets de ICI et SAHA, en traitement combiné, sur le cycle cellulaire reposerait sur leur coopération à réguler les gènes cibles des œstrogènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, qui pourrait mener à des phénomènes apoptotiques.

---

### 2.1.2. RÔLE DE L' APOPTOSE DANS LA SYNERGIE

Les résultats des courbes de croissance dose-réponse, ainsi que le blocage du cycle cellulaire en G2/M laissent penser que de l'apoptose survient en réponse au traitement combiné ICI et SAHA. Afin de le mettre en évidence, des cellules MCF-7, traitées par ICI et SAHA seuls ou combinés, pourraient être marquées à l'annexine V

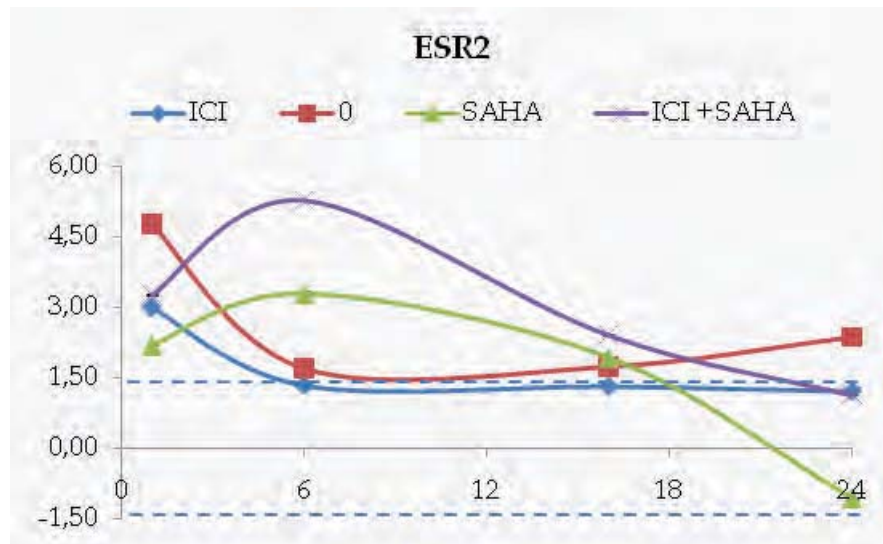
et au propidium iodide, puis le marquage mesuré par FACS. Au préalable, les niveaux d'expression de différents gènes pro- ou anti-apoptotiques ont été mesurés. Les cellules ont été exposées aux œstrogènes et traitées par ICI et SAHA seuls ou combinés, pendant 1h à 24h, puis la transcription des gènes évalués par qPCR. Les gènes pro-apoptotiques, tels que *TRAIL*, *APAF-1* ou *CASP-9*, ont tendance à être régulés à la hausse par E2, tandis que les gènes anti-apoptotiques, comme *BIRC5* présentent la régulation inverse, conformément aux modèles publiés (article 3 figure 8 et data not shown) (Bolden *et al.*, 2006). Ces expériences restent à répéter afin d'en vérifier les conclusions. Les régulations observées, en réponse aux traitements ICI et SAHA, sont faibles, probablement du fait des doses utilisées. Parmi les gènes impliqués dans l'apoptose testés, seuls les gènes cibles des œstrogènes *CASP-9* et *BIRC5*, présentent une régulation coopérative du co-traitement ICI et SAHA. Cela illustre, comme dans le cas des gènes du cycle cellulaire, le côté ER-dépendant de la coopération ICI et SAHA. Il serait également intéressant de suivre l'expression des protéines apoptotiques telles que Bcl-2 par western blot. En effet, en plus d'influencer la transcription des gènes pro- et anti-apoptotiques, les HDACs induisent l'apoptose des cellules via des modifications post-traductionnelles de protéines pro-apoptotiques, comme par exemple le clivage et l'activation de Bid (Frew *et al.*, 2009; Peart *et al.*, 2003; Ruefli *et al.*, 2001). Les effets coopératifs de ICI et SAHA sur la régulation de la transcription des gènes cibles des œstrogènes et apoptotiques, pourraient être impliqués dans la synergie au niveau de la prolifération des cellules.

### 2.1.3. IMPLICATION DE ER $\beta$ DANS LA SYNERGIE

Autant le rôle de ER $\alpha$  dans le cancer du sein est très étudié, ce récepteur constituant un marqueur prédictif de la thérapie endocrine, autant celui de ER $\beta$  est relativement peu connu. Néanmoins, Hopp *et al.* (Hopp *et al.*, 2004) ont établie que, ER $\beta$  constitue un facteur pronostique indépendant de la survie sans rechute des patients atteints de cancer du sein et recevant du tamoxifène en traitement adjuvant



(Hodges-Gallagher *et al.*, 2008; Iwase *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2001). En fait, ER $\beta$  serait un suppresseur de tumeur, non seulement dans le cancer du sein, mais aussi dans les cancers des ovaires, de la prostate et du colon (Bardin *et al.*, 2004). Pour preuve, ce récepteur est fortement exprimé dans les tissus mammaires normaux tandis que son expression est fréquemment perdue au cours de la carcinogenèse (Shaaban *et al.*, 2003; Skliris *et al.*, 2003). De plus, plusieurs études montrent, que l'augmentation de l'expression de ER $\beta$  dans les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives, corrèle avec une baisse de leur prolifération (Murphy *et al.*, 2005; Omoto *et al.*, 2003; Paruthiyil *et al.*, 2004). En fait, l'hypothèse selon laquelle, ER $\beta$  agirait comme un régulateur négatif des effets de ER $\alpha$  est fréquemment énoncée (Chang *et al.*, 2006; Lindberg *et al.*, 2003; Paruthiyil *et al.*, 2004; Strom *et al.*, 2004). En ce sens, Peekhaus *et al.* ont démontré que les cellules MCF-7 sur-exprimant ER $\beta$ , dégradent ce dernier en présence de E2, par contre l'ajout de ICI stabilise ER $\beta$  (Peekhaus *et al.*, 2004). Dans le même ordre d'idée, Hodges-Gallagher *et al.* ont mis en évidence que l'augmentation de l'expression de ER $\beta$  favorise, spécifiquement, les effets des anti-œstrogènes, totaux et partiels, sur le blocage de la progression du cycle cellulaire et l'augmentation de l'apoptose dans les MCF-7 (Hodges-Gallagher *et al.*, 2008). Or, nos résultats montrent que la transcription de ER $\beta$  est potentialisée par SAHA et encore plus par le traitement combiné ICI et SAHA (figure 29). Ceci laisse penser qu'il participe à la synergie des effets de ICI et SAHA sur l'inhibition de la croissance des cellules mammaires ER $\alpha$ -positives, MCF-7 et ZR-75, qui sont aussi ER $\beta$ -positives. (Cette expérience devra être répétée). Ainsi, **l'augmentation de l'expression de ER $\beta$  par SAHA ou ICI et SAHA, potentialiserait les effets de ICI sur la prolifération des cellules, le cycle cellulaire et l'apoptose.** Cette hypothèse est soutenue par l'implication de ER $\beta$  dans la coopération des effets des HDACis et des anti-œstrogènes partiels, dans les cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -négatives. En effet, l'augmentation de l'expression de ER $\beta$  et de son import nucléaire par TSA, permet de sensibiliser les cellules ER $\alpha$ -positives devenues résistantes aux anti-œstrogènes ou les cellules ER $\alpha$ -négatives aux traitements anti-œstrogénique



*Figure 29 : Régulation de la transcription du gène ESR2 par ICI et SAHA*

Expression génique relative de ESR2, dans des cellules mammaires tumorales ERa-positives, MCF-7, en réponse à des traitements par ICI et SAHA seuls, ou combinés. Les niveaux de transcription ont été évalués par q-PCR, selon la méthode décrite dans l'article 3. Les résultats sont représentés sous forme de ratio de l'expression d'ARNm dans les cellules traitées par rapport, aux cellules non-traitées (véhicule). L'expression relative ainsi obtenue et leurs écart-types représentent des triplicats.

(Jang *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2009). Dans notre cas, l'impact de l'augmentation de l'expression de ER $\beta$  et son rôle dans la potentialisation des effets de ICI sur la prolifération des cellules, le cycle cellulaire et l'apoptose, pourraient être clarifiés par diverses expériences. Pour commencer, la corrélation entre les niveaux protéiques de ER $\beta$  et les niveaux d'ARNm pourrait être validée. Par la suite, l'utilisation de siRNA sélectivement dirigés contre ER $\alpha$  ou ER $\beta$ , devrait nous permettre de distinguer leurs rôles respectifs dans la synergie des effets de ICI et SAHA sur la répression de la croissance des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives. A l'inverse, si l'hypothèse susmentionnée se vérifie, la sur-expression de ER $\beta$ , devrait provoquer un accroissement de la synergie, tout comme l'ajout d'un agoniste spécifique de ER $\beta$ , tel que le DPN (diarylpropionitrile). Par contre, la sur-expression de ER $\alpha$ , devrait la réduire, voir l'inhiber, comme l'addition de PPT (Propyl pyrazoletriyl trisphenol), agoniste spécifique de ER $\alpha$ . De plus, l'absence totale de synergie, dans les cellules ER $\alpha$ -négatives, atteste de l'implication de ER $\alpha$  dans la survenue de la synergie. Ainsi, l'implication de ER $\beta$  ne devrait pas permettre la survenue de la synergie dans des cellules tumorales mammaires ER $\beta$ -négatives. Une courbe de croissance dose-réponse permettrait de vérifier cette assertion. Le fait que les cellules ER $\alpha$ -négatives ne répondent pas à la synergie, quelque soit leur statut au regard de ER $\beta$  (les lignées de cellules MDA-MB-231 et SK-BR3 sont ER $\alpha$ -négatives ER $\beta$ -positive et ER $\beta$ -négative, respectivement) semble indiquer un rôle prépondérant de ER $\alpha$  par rapport à ER $\beta$ .

L'implication de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans la survenue de la synergie de ICI et SAHA sur l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives permet d'expliquer, au moins en partie, l'absence totale de coopération dans les cellules ER $\alpha$ -négatives. Les effets de ICI et SAHA sur la croissance ou le cycle cellulaire des cellules ER $\alpha$ -négatives MDA-MB-231 ou SK-BR3, correspondent aux effets de SAHA uniquement. Ainsi, le traitement par SAHA, aux doses utilisées, ne permet pas de sensibiliser ces cellules à l'anti-œstrogène total ICI.

## 2.2. RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION ŒSTROGÈNO-DÉPENDANTE PAR LES HDACIS ET POTENTIALISATION PAR ICI

La modulation de la progression du cycle cellulaire par ICI et SAHA semble résulter, au moins en partie, de la régulation de la transcription de gènes cibles des œstrogènes. Afin de mieux comprendre l'impact du co-traitement ICI et SAHA sur la transcription œstrogène-dépendante des gènes, il était nécessaire de clarifier celui des HDACis seuls. Pour ce faire, l'impact d'une forte concentration de TSA, en présence ou en absence de stimulation œstrogénique, sur la transcription globale des gènes des cellules MCF-7 a été suivi.

### 2.2.1. IMPACT DES HDACIS SUR LA TRANSCRIPTION ŒSTROGÈNO-DÉPENDANTE

#### 2.2.1.1. TSA MASQUE RAPIDEMENT LES EFFETS DES ŒSTROGÈNES

Dès 3h de traitement, par une dose élevée de TSA réduit fortement l'impact des œstrogènes sur l'expression globale des gènes des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -positives MCF-7. En effet, la régulation de la transcription des gènes par E2 est inactivée pour 48% des gènes et réduite pour 23% d'entre eux (article 3 figure 5). Ainsi, TSA masque les effets de E2, et l'expression des gènes en présence de E2 et TSA correspond à celle en présence de TSA seulement, +/-10% (article 3 figure 5). Les effets anti-œstrogéniques de TSA ne peuvent s'expliquer par la répression de l'expression de ER $\alpha$ , puisqu'après 3h de traitement seulement, le récepteur est encore présent, en quantité comparable à la condition en absence de traitement. De plus, sa transcription n'est que faiblement diminuée par rapport aux effets observés après 16 ou 24h de traitement (article 3 figure 7).

De nombreuses hypothèses tentent d'expliquer les effets rapides de TSA. Ces derniers pourraient résulter de **l'immobilisation ou de la séquestration de ER $\alpha$** ,

étape qui pourrait précéder sa dégradation. Ainsi, même si les niveaux de ER $\alpha$  semblent similaires, sa biodisponibilité est grandement réduite. C'est par exemple le cas en réponse à ICI : ER $\alpha$  est rapidement immobilisé au sein d'une matrice nucléaire, ce qui est associé à un changement de ses propriétés d'extraction (Htun *et al.*, 1999; Matsuda *et al.*, 2008; Stenoien *et al.*, 2000; Stenoien *et al.*, 2001; Stenoien *et al.*, 2001). Afin de mettre en évidence l'immobilisation du récepteur, des expériences de recouvrement de la fluorescence après photobleaching pourraient être réalisées à l'aide d'un ER $\alpha$  marqué à l'aide d'une protéine fluorescente. Si, comme en présence de ICI, ER $\alpha$  est séquestré dans un compartiment nucléaire insoluble avec des sels (Callige *et al.*, 2005; Giamarchi *et al.*, 2002), des expériences de fractionnement cellulaire suivit de western blot permettraient de détecter la présence de ER $\alpha$  dans les différents compartiments cellulaires : cytosol, noyau, fraction insoluble du noyau (Giamarchi *et al.*, 2002). Afin de déterminer si la séquestration de ER $\alpha$  met en jeu une protéine chaperonne ou un complexe protéique, quelques expériences pourraient être réalisées. L'immunoprécipitation de ER $\alpha$  suivie de l'identification des complexes différentiels (entre les traitements avec et sans HDACi) permettrait de spécifier les partenaires de ER $\alpha$  dans ces conditions.

Les effets rapides de TSA pourraient aussi résulter de **l'acétylation de ER $\alpha$** , qui aurait pour conséquence : de réduire sa liaison à l'ADN, d'augmenter ses interactions avec des co-répresseurs, ou à l'inverse, de réduire ses interactions avec des co-activateurs, de diminuer sa stabilité ou encore d'altérer sa localisation cellulaire (Bannister *et al.*, 2000; Freiman *et al.*, 2003; Sterner *et al.*, 2000). Cependant, l'acétylation de ER $\alpha$  semble avoir un impact opposé. En effet, il a été démontré que les lysines 302 et 303 de ER $\alpha$  peuvent être directement acétylées par p300, modulant ainsi son activation transcriptionnelle et sa sensibilité aux œstrogènes (Wang *et al.*, 2001). Cette expérience ont été réalisé dans des cellules ER $\alpha$ -négatives MDA-MB-231 et HeLa transfectées avec ER $\alpha$ . Ainsi, l'acétylation de ER $\alpha$ , après traitement par des HDACis, augmente son activité transcriptionnelle basale, mais diminuant sa transcription œstrogène-dépendante (Wang *et al.*, 2001). ER $\alpha$  peut également être acétylé au niveau des lysines 266 et 268, en présence des co-

activateurs p160 et p300, ce qui a pour conséquence d'augmenter sa liaison à l'ADN mais aussi son activité transcriptionnelle (Kim *et al.*, 2006). Plus récemment, il a été démontré que TSA augmente la stabilité de p300 et ainsi l'acétylation de ER $\alpha$  par cette dernière. Ceci augmente la stabilité du récepteur en bloquant l'ubiquitination qui précède sa dégradation (Kim *et al.*, 2010). Cependant, ces études ont été réalisées dans des cellules tumorales mammaires ER $\alpha$ -négatives, où le récepteur était surexprimé, non pas avec des cellules exprimant un ER $\alpha$  endogène. A moins que d'autres lysines de ER $\alpha$  puissent être acétylées et engendrent des effets différents, l'impact de TSA sur les cellules ER $\alpha$ -positives ne semblent pas impliquer l'acétylation du récepteur. L'identification d'autres résidus de ER $\alpha$  pouvant être acétylés pourrait être réalisée à l'aide d'analyses protéomiques. L'équipe de Baldwin M.A. a ainsi mis en évidence une nouvelle lysine acétylée (ou la tri-méthylation) : Lys472 dans le domaine LBD/AF-2 (Atsriku *et al.*, 2009). La mutation des lysines acétylables identifiées en glutamine (permettant de mimer l'effet de l'acétylation des lysines) permettrait de mettre en évidence l'impact de l'acétylation de ER $\alpha$  de ces nouveaux sites.

**L'acétylation de cofacteurs** interagissant avec ER $\alpha$  pourrait être impliquée dans les effets observés. L'acétylation de co-répresseurs pourrait augmenter leurs liaisons avec ER $\alpha$  ou celle de co-activateurs réduire la leur, ou encore influencer l'activité d'un cofacteur lié à ER $\alpha$  ou son activité transcriptionnelle. Par exemple, le co-activateur NRIP1 (RIP140) exerce des activités de corépresseur lorsqu'il est hyper-acétylé (Huq *et al.*, 2005). De la même manière, l'acétylation de ACTR, par p300 or CBP, inhibe son interaction avec ER $\alpha$  agoniste, réduisant ainsi la transcription œstrogène-dépendante (Chen *et al.*, 1999; Moggs *et al.*, 2001). L'identification différentielle des partenaires de ER $\alpha$  en conformation agoniste (sous stimulation par E2) en présence et en absence de traitement HDACi pendant 3h, permettrait une meilleure compréhension des acteurs impliqués dans l'inhibition de la transcription œstrogène-dépendante. Pour ce faire, une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti- ER $\alpha$  (tel que B-10 ou HC-20) pourrait être suivie de l'identification des partenaires de ER $\alpha$  par des analyses protéomiques.

Nos résultats semblent également mettre en évidence **l'implication des EREs**. Puisque l'enrichissement de régions liées par ER $\alpha$  (donc riche en EREs) varie en fonction de la régulation des gènes œstrogène-régulés par TSA (article 3 figure 6). Les gènes dont la transcription correspond à l'atténuation des effets de E2 par TSA et ceux pour lesquels E2 et TSA coopèrent, présentent un enrichissement de régions liées par ER $\alpha$  (entre 6 et 14 fois supérieur à l'ensemble des gènes). Ceci pourrait être conciliable avec l'hypothèse selon laquelle l'activité des partenaires de ER $\alpha$  est modulée par acétylation. Dans un premier temps, il serait intéressant d'identifier les types d'éléments de réponse à proximité des gènes de ces 2 catégories, afin de déterminer si l'un d'eux est enrichi, tels que les EREs parfaits, les sites sp1-ERE... Afin de valider expérimentalement les résultats obtenus, des expériences de CHIP pourrait être utilisées.

#### 2.2.1.2. EFFETS INDIRECTS DE TSA SUR LA TRANSCRIPTION DES GÈNES CIBLES DES ŒSTROGÈNES VIA LA DÉPLÉTION DE ER $\alpha$

Contrairement aux nombreuses hypothèses pouvant expliquer la réponse au traitement TSA 3h, les effets de TSA à forte dose après 24h de traitement résulte clairement de la déplétion de ER $\alpha$  dans les cellules. En effet, à partir de 16h de traitement, les niveaux de récepteurs ne sont plus détectables par western blot et les niveaux d'ARNm messager sont 40 fois plus faibles que ceux du contrôle (article 3 figure 7). Ainsi, c'est sans surprise que la transcription des gènes en présence de E2 et TSA correspond à la transcription des gènes en présence de TSA seul, +/-2%. Plus particulièrement, l'œstrogène-régulation des gènes répondant à TSA est inactivée pour 90% des gènes (article 3 figure 5). Cette répression de ER $\alpha$ , au niveau ARNm et protéique, correspond aux résultats déjà publiés, par notre laboratoire et par d'autres (Alao *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005). Les effets des HDACis sur l'inhibition de la transcription de ER $\alpha$  sont connus depuis de nombreuses années, puisqu'en 1992 déjà, De Fazio *et al.* mettaient en évidence l'inhibition de la transcription du gène ESR1 en présence de sodium butyrate (deFazio *et al.*, 1992). Par la suite, différents groupes ont démontré l'inhibition de la

transcription de ESR1 dans les cellules mammaires normales ou tumorales ER $\alpha$ -positives (Travaglini *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2008) par des mécanismes directs (Alao *et al.*, 2004) ou indirects (Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005) selon les auteurs. L'induction de la dégradation protéasome-dépendante de ER $\alpha$  par les HDACis est illustrée dans de nombreuses lignées cellulaires ER $\alpha$ -positives : mammaires, ovarienne ou endométriale (Margueron *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005). Plus récemment, l'implication de l'acétylation de la chaperonne Hsp90 a été démontrée. SAHA ou l'inhibition de HDAC6 provoque une hyperacétylation de Hsp90, qui se traduit pas une perte de son activité de chaperonne, libérant ainsi ses protéines cibles telles que ER $\alpha$ . Le récepteur libéré est alors ubiquitinilé puis dégradé par le protéasome (Fiskus *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2008). Néanmoins, afin de démontrer avec certitude que les effets de TSA observés à 24h résultent bien de la déplétion de ER $\alpha$ , l'expression de quelques gènes cibles des œstrogènes en réponse à TSA pourrait être suivie, dans des cellules MCF-7 sur-exprimant un ER $\alpha$  exogène non dégradable et dans des cellules MCF-7 contrôles.

L'inhibition de la transcription œstrogène-dépendante par de fortes doses de HDACis est indiscutable et résulte, tel que mentionné ci-dessus, de la déplétion de ER $\alpha$ . Cependant, des doses moindres de HDACi démontrent des effets plus variables, parfois opposés.

### 2.2.1.3. EFFET BI-MODAL DES HDACIS SUR LA TRANSCRIPTION ERE-DÉPENDANTE INDUITE PAR LES ŒSTROGÈNES

Suivant les doses utilisées, les HDACis peuvent activer ou inhiber la transcription ERE-dépendante. Par exemple, 24h de traitement TSA avec des concentrations allant de 5 à 100nM augmente de manière dose-dépendante la transcription d'un gène cible sous contrôle d'EREs dans des cellules HeLa exprimant un récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  exogène (Wang *et al.*, 2001). Ainsi de faibles quantités de TSA sont capables d'augmenter la transcription ERE-dépendante. A l'inverse et selon le modèle couramment accepté, les fortes concentrations de TSA (30nM à 1000nM absence E2 dans 3), VPA (acide valproïque) (0,3 à 10mM



absence E2 dans 3) ou SAHA (5 et 10 $\mu$ m +E2 dans 493) diminuent la transcription ERE-dépendante (Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Yi *et al.*, 2008). Ces résultats montrent que l'inactivation de la transcription œstrogène-dépendante par les HDACis résulte principalement de la dégradation de ER $\alpha$ . Néanmoins, ces expériences ont été réalisées, soit en présence, soit en absence d'œstrogènes, mais ces deux conditions n'ont pas été comparées au sein d'une même étude.

Nos résultats regroupent ces différentes observations en démontrant l'effet bi-phasique de SAHA, en fonction de sa concentration, sur la transcription ERE-dépendante. La transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur contenant des EREs est stimulée, de manière E2-dépendante, par des concentrations de SAHA comprises entre 30nM et 1250nM, et ce malgré une baisse de la quantité de ER $\alpha$  dans la cellule (observée par western blot à 300nM) (article 3 figure 9 et 7). Des concentrations égales ou supérieures de SAHA provoquent une diminution de la transcription ERE-dépendante. Néanmoins, ces résultats restent à reproduire afin d'être plus amplement confirmés. SAHA semble aussi augmenter la transcription ERE-dépendante basale, sans toutefois atteindre des niveaux de transcription équivalents à ceux obtenus en présence de stimulation œstrogénique. Cet effet bi-phasique est observable dans des résultats publiés par notre laboratoire et par d'autres équipes utilisant d'autres composés HDACis. TSA exerce un effet bi-phasique clair dans les cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -négatives MDA-MB-231, avec une induction de la transcription ERE-dépendante maximale à 165nM (Jang *et al.*, 2004). Par contre, dans les cellules mammaires tumorales ou endométriales ER $\alpha$ -positives, MCF-7 et Ishikawa (respectivement), TSA ne présente pas clairement cet effet bi-phasique, puisque l'augmentation de la transcription ERE-dépendante n'est pas significative (data not shown) (Reid *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que l'acétylation de ER $\alpha$  (au moins aux positions 202 et 203) ne semble pas en cause, du moins dans le cas de TSA, puisque l'utilisation d'un mutant non-acétylable K302A-K303A permet d'obtenir des résultats similaires (Rocha *et al.*, 2005). VPA présente, quant à lui, le même effet bi-phasique que SAHA dans des cellules MCF-7 (Reid *et al.*, 2005). Tout comme avec TSA, la diminution de la

transcription ERE-dépendante par SAHA résulte de la diminution des niveaux de ER $\alpha$  cellulaires. En effet, la surexpression d'un ER $\alpha$  exogène, permet une augmentation constante de la transcription ERE-dépendante induite par les œstrogènes, même pour des doses supérieures à 1250nM (article 3 figure 9). Des résultats similaires ont été obtenus avec TSA (data not shown). Cet effet semble œstrogène-dépendant puisqu'à l'état basal, la transcription n'augmente que faiblement.

Ces résultats nous permettent d'observer que SAHA augmente la transcription ERE-dépendante de manière œstrogène-dépendante en fonction de la quantité de ER $\alpha$  disponible. Ainsi, la transcription ERE-dépendante, en réponse au traitement SAHA, résulte de la balance des effets de ce dernier : augmentation de la transcription ERE-dépendante d'une part et diminution des niveaux de ER $\alpha$  disponible dans la cellule d'autre part. Ainsi aux faibles doses, une augmentation de la transcription est observée puisque la dégradation de ER $\alpha$  est faible. Tandis que de fortes doses de SAHA induisent une déplétion de ER $\alpha$  de la cellule ne permettant plus à SAHA d'augmenter la transcription ERE-dépendante de manière ER $\alpha$ - et œstrogène-dépendante. Il aurait été intéressant de compléter ces résultats en observant parallèlement les niveaux cellulaires de ER $\alpha$ , afin d'obtenir une meilleure visualisation des conclusions énoncées. Les contrôles négatifs : plasmide d'expression vide ou vecteur rapporteur TATA (sans ERE) mis en présence des différents traitements, permettent de vérifier que l'augmentation de la transcription observée en présence de SAHA dépend bien de ER $\alpha$ , des œstrogènes et de la présence d'ERE. Les effets observés ne résultent donc pas d'un effet artéfactuel de SAHA sur la transcription du vecteur contenant le gène rapporteur (data not shown).

L'augmentation de la transcription ERE-dépendante par SAHA pourrait résulter de l'inhibition de différentes HDACs. Par exemple, HDAC1 est reconnue pour lier ER $\alpha$ , et l'augmentation de son expression provoque une baisse de la transcription ERE-dépendante (Kawai *et al.*, 2003). L'inhibition de HDAC1 pourrait, ainsi, permettre de dé-réprimer la transcription ERE-dépendante et provoquer son augmentation. Ainsi, la hausse de la transcription observée en présence de SAHA ne

résulterait pas d'un effet direct mais plutôt de l'inhibition d'un répresseur. ER $\alpha$  interagit également avec HDAC4 (Leong *et al.*, 2005). Tout comme HDAC1, l'augmentation de l'expression de HDAC4 crée une baisse de la transcription ERE-dépendante. Conformément à l'hypothèse énoncée ci-dessus, une faible dose de TSA (80nM) augmente fortement la transcription ERE-dépendante dans les cellules COS-7 exprimant un ER $\alpha$  exogène. La sur-expression de HDAC4 dans ces cellules permet encore l'augmentation de la transcription ERE-dépendante par TSA, mais moins (Leong *et al.*, 2005). Ainsi l'inhibition des HDAC1 et/ou 4 par de faibles doses de SAHA serait responsable de l'augmentation de la transcription ERE-dépendante. Leur implication pourrait être mise en évidence par leur sur-expression, qui devrait abolir, ou du moins limiter, la hausse de la transcription en réponse aux faibles doses de SAHA. Si leur inhibition est seule responsable des phénomènes observés, la répression de leur expression par siRNA devrait également permettre une augmentation de la transcription ERE-dépendante. L'utilisation de HDACi avec des spécificités restreintes pourraient également permettre d'identifier le ou les HDACs impliqués dans les phénomènes observés.

Les résultats de transcription du gène rapporteur luciférase corrént avec l'expression des gènes cibles primaires des œstrogènes endogènes, comme GREB1 ou PGR, par exemple (article 3 figure 8). Néanmoins, ces résultats ne concordent pas pour tous les gènes, probablement du fait de l'implication de nombreux facteurs dans les régulations des gènes endogènes.

Les HDACis influencent donc plusieurs niveaux de la signalisation œstrogénique, de l'expression du récepteur ER $\alpha$  à la transcription ERE-dépendante des gènes cibles des œstrogènes.

### 2.2.2. POTENTIALISATION DES EFFETS DES HDACIS SUR LA TRANSCRIPTION ŒSTROGÈNO-DÉPENDANTE PAR ICI

Les effets de SAHA sur la voie de signalisation des œstrogènes peuvent être potentialisés par la présence de l'anti-œstrogène total ICI. En effet, ICI et SAHA coopèrent pour réduire plus rapidement les niveaux de récepteur ER $\alpha$  dans les cellules (article 3 figure 7). Le mécanisme de cette coopération reste à mettre en évidence. ICI ou SAHA pourraient potentialiser leur effet l'un l'autre, par exemple, au niveau de la dégradation protéosomale de ER $\alpha$  ou encore via son immobilisation. Les expériences proposées afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place par SAHA pour réduire les niveaux de ER $\alpha$  cellulaire (paragraphe 2.1) pourraient être réalisées en parallèle en présence de ICI et SAHA. Ceci permettrait de visualiser leurs mécanismes en commun. Par contre, ICI et SAHA ne semblent pas coopérer pour réprimer la transcription du gène ESR1 (data not shown). A l'inverse la transcription des gènes cibles primaires des œstrogènes démontre un effet coopératif clair de ICI et SAHA qui résulte de la potentialisation des effets de SAHA par ICI sur la transcription ERE-dépendante.

Tel que mentionné ci-dessus, l'impact de SAHA sur la transcription ERE-dépendante résulte de la balance de ses effets qui augmente la transcription ERE-dépendante mais réduit la quantité de ER $\alpha$  au niveau protéique et ARN. Or ICI baisse les niveaux de ER $\alpha$  tout comme les fortes doses de SAHA. De ce fait, ICI mime les effets des fortes doses de SAHA et permet aux faibles doses de SAHA de diminuer la transcription ERE-dépendante, en déplaçant l'équilibre (article 3 figure 9). Ceci corrèle avec le fait que seule la transcription des gènes cibles primaires des œstrogènes (Bourdeau *et al.*, 2004) présente une coopération des effets de ICI et SAHA (article 3 figure 8). La corrélation est d'autant plus forte que l'ajout de ICI à une faible dose de SAHA (300nM) provoque le même effet sur la cinétique de transcription qu'une forte dose de SAHA (1000nM). Le fait que seule la transcription des gènes cibles primaires des œstrogènes présente les effets coopératifs de ICI et SAHA, montre que cette coopération repose sur les effets anti-œstrogéniques de ICI et sur la présence d'ERE.

Contrairement à ce que des résultats précédemment publiés auraient pu laisser croire, SAHA, même à forte dose, ne fait pas de ICI un agoniste du récepteur ER $\alpha$ . Il avait été démontré que de forte concentration de TSA (1620nM) associée à de faible quantité de ER $\alpha$  fait des anti-œstrogènes des agonistes capables d'induire la transcription du gène luciférase sous contrôle d'EREs dans les cellules MCF-7 (Margueron *et al.*, 2004). Les dissensions entre les résultats proviennent probablement des concentrations utilisées ICI 10nM par rapport à 100nM dans notre cas, de plus la gamme de concentrations de SAHA observées n'atteint pas de niveau équivalent à celle de TSA utilisée, mais reste plus proche de concentrations utilisables en cliniques. La régulation de la transcription des gènes cibles des œstrogènes endogènes confirme le fait qu'ICI conserve ses capacités de trans-répression de la transcription en présence de SAHA, à des doses utilisables en cliniques.

Ainsi ajouter ICI à SAHA permet de réduire les doses efficaces de ce dernier, sans pour autant gêner les capacités antagonistes de ICI sur la répression de la transcription œstrogène- ERE-dépendante. Cette réduction de seuil de concentration de SAHA nécessaire pour inhiber la transcription ERE-dépendante en présence de ICI repose sur la diminution accrue et/ou plus rapide de ER $\alpha$  dans les cellules.

### 2.3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La synergie des effets de ICI et SAHA inhibant de manière accrue la prolifération des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives présage du fait que cette combinaison pourrait être un traitement efficace et relativement ciblé pour les patientes atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ -positif. Cette synergie devrait permettre de réduire les doses tout en conservant la même efficacité. Afin d'établir ces effets dans un système animal, des xénogreffes de cellules tumorales MCF-7 dans des souris athymiques pourraient être envisagées. Elles permettraient également de tester l'augmentation de spécificité du traitement par rapport aux composés seuls du fait de

la réduction de doses. Néanmoins, les deux composés ayant des effets délétères sur le tissu osseux (McGee-Lawrence *et al.*, 2011; Turner, 1999), il serait également important de vérifier l'impact du co-traitement ICI et SAHA sur le métabolisme osseux. La genèse de composés hybrides pourrait également combiner les avantages des deux drogues, en ayant une seule pharmacologie. Cependant de tels composés n'ont jusque là présenté que de faibles efficacités ou une seule des deux activités : anti-œstrogènes ou HDACi. Les effets antiprolifératifs synergique observés en présence des deux composés ICI et SAHA, semble reposé sur un arrêt du cycle cellulaire et probablement des phénomènes apoptotiques. Ils sembleraient également impliquer le récepteur des œstrogènes ER $\beta$  en plus de réprimer ER $\alpha$ . Les HDACi ajoutent une composante transcriptionnelle importante aux effets de ICI. Son étude a permis de comprendre le mécanisme sous-jacent à l'effet bi-phasique des HDACis sur la transcription ERE-dépendante. Elle a également permis de mettre en évidence le fait que ICI et SAHA potentialise l'un l'autre leur effet sur la dégradation du récepteur des œstrogènes ER $\alpha$  et l'inhibition de la transcription des gènes cibles des œstrogènes ERE-dépendante. Afin d'augmenter encore la compréhension de ces mécanismes, et donc de la synergie des effets de ICI et SAHA, l'analyse du transcriptome de cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives en réponse au traitement combiné par rapport aux traitements seuls pourrait être réalisée en présence d'œstrogènes.

**CONCLUSION**





Les récepteurs des œstrogènes appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires, ce sont donc des facteurs de transcription ligand dépendant. Leur liaison à l'ADN constitue alors une étape cruciale de leur mécanisme d'action tripartite. Les articles 1 et 2 constituent une étude complète de spécificité de liaison des récepteurs des œstrogènes à leurs EREs. Elle a permis de déterminer le rôle de chacun des déterminants acides aminés et bases dans cette interaction et de mettre en évidence la possibilité de générer de nouvelles spécificités de liaison transcriptionnellement actives. Bien des progrès sont encore nécessaires, notamment en bio-informatique, néanmoins ces résultats laissent tout de même entrevoir la possibilité d'utiliser les récepteurs nucléaires hormonaux comme outils en thérapie génique. Ils auraient l'avantage de permettre un contrôle spacio-temporel de l'expression du gène sous leur contrôle.

Notre 2<sup>ème</sup> axe de recherche, composé de l'article 3, visant à déterminer l'impact que pourrait avoir le traitement combiné ICI et SAHA sur des cellules mammaires tumorales a permis de mettre en évidence leurs effets synergiques sur l'inhibition de la croissance des cellules mammaires tumorales ER $\alpha$ -positives exclusivement, ainsi que les mécanismes impliqués. La validation de ces effets dans des modèles animaux constitue la prochaine étape de test de cette thérapie en vue du traitement personnalisé de patientes atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ -positifs.



## **BIBLIOGRAPHIE**

## REFERENCES

- Addo, S., *et al.* (2002). "A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers." Br J Cancer **87**(12): 1354-1359.
- Alao, J. P., *et al.* (2004). "Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines." Clin Cancer Res **10**(23): 8094-8104.
- Alao, J. P., *et al.* (2006). "Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A induces ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation in MCF-7 breast cancer cells." Mol Cancer **5**: 8.
- Ali, S., *et al.* (2002). "Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance." Nat Rev Cancer **2**(2): 101-112.
- Ali, S., *et al.* (2002). "Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance." Nature Reviews Cancer **2**(2): 101-112.
- Ali, S., *et al.* (1993). "Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region." EMBO Journal **12**(3): 1153-1160.
- Allen, E., *et al.* (1923). "An ovarian hormone: preliminary report on its localization, extraction and partial purification and action in test animals. ." J. Am. Med. Assoc.(81): 2.
- Allfrey, V. G., *et al.* (1964). "Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **51**: 786-794.
- Altschul, S. F., *et al.* (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Ameyra-Zazoua, M., *et al.* (2006). "Rôle des inhibiteurs des histones désacétylases en thérapie antitumorale." Bulletin du Cancer Hors-série: 5.
- Anderson, E. (2002). "The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis." Breast Cancer Research **4**(5): 197-201.
- Anolik, J. H., *et al.* (1995). "Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand." Biochemistry **34**(8): 2511-2520.
- Anzai, Y., *et al.* (1989). "Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line)." Cancer Research **49**(9): 2362-2365.
- Anzano, M. A., *et al.* (1994). "Prevention of breast cancer in the rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen." Cancer Res **54**(17): 4614-4617.
- Arnold, S. F., *et al.* (1995). "Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro." Molecular Endocrinology **9**(1): 24-33.

- Atmaca, A., *et al.* (2007). "Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial." British Journal of Cancer **97**(2): 177-182.
- Atsriku, C., *et al.* (2009). "Systematic mapping of posttranslational modifications in human estrogen receptor-alpha with emphasis on novel phosphorylation sites." Mol Cell Proteomics **8**(3): 467-480.
- Bannister, A. J., *et al.* (2000). "Regulation of gene expression by transcription factor acetylation." Cell Mol Life Sci **57**(8-9): 1184-1192.
- Bardin, A., *et al.* (2004). "Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression." Endocr Relat Cancer **11**(3): 537-551.
- Batty, N., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents." Cancer Lett **280**(2): 192-200.
- Baylin, S. B., *et al.* (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" Nature Reviews Cancer **6**(2): 107-116.
- Beckers, T., *et al.* (2007). "Distinct pharmacological properties of second generation HDAC inhibitors with the benzamide or hydroxamate head group." Int J Cancer **121**(5): 1138-1148.
- Beerli, R. R., *et al.* (2002). "Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors." Nat Biotechnol **20**(2): 135-141.
- Belani, C. P., *et al.* (1989). "Tamoxifen withdrawal response. Report of a case." Archives of Internal Medicine **149**(2): 449-450.
- Benos, P. V., *et al.* (2002). "Additivity in protein-DNA interactions: how good an approximation is it?" Nucleic Acids Res **30**(20): 4442-4451.
- Benz, C., *et al.* (1983). "Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: cytotoxic synergism in vitro." Cancer Res **43**(11): 5298-5303.
- Berry, N. B., *et al.* (2008). "Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome." Molecular Endocrinology **22**(7): 1535-1551.
- Bjornstrom, L., *et al.* (2001). "Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells." J Mol Endocrinol **27**(1): 93-106.
- Bjornstrom, L., *et al.* (2002). "Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1)." J Biol Chem **277**(50): 48479-48483.
- Bjornstrom, L., *et al.* (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." Mol Endocrinol **19**(4): 833-842.
- Bjornstrom, L., *et al.* (2005). "Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes." Molecular Endocrinology **19**(4): 833-842.
- Black, L. J., *et al.* (1994). "Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats." Journal of Clinical Investigation **93**(1): 63-69.
- Blancafórt, P., *et al.* (2005). "Genetic reprogramming of tumor cells by zinc finger transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11716-11721.

- Blobel, G. A., *et al.* (1995). "Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor." Molecular and Cellular Biology **15**(6): 3147-3153.
- Blumenschein, G. R., Jr., *et al.* (2008). "Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer." Investigational New Drugs **26**(1): 81-87.
- Blumenschein, G. R., Jr., *et al.* (2008). "Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer." Invest New Drugs **26**(1): 81-87.
- Bocchinfuso, W. P., *et al.* (1997). "Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice." Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia **2**(4): 323-334.
- Bocchinfuso, W. P., *et al.* (1997). "Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice." J Mammary Gland Biol Neoplasia **2**(4): 323-334.
- Bolden, J. E., *et al.* (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nature Reviews. Drug Discovery **5**(9): 769-784.
- Bolden, J. E., *et al.* (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 769-784.
- Bourdeau, V., *et al.* (2004). "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse." Mol Endocrinol **18**(6): 1411-1427.
- Bourdeau, V., *et al.* (2004). "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse." Molecular Endocrinology **18**(6): 1411-1427.
- Bowler, J., *et al.* (1989). "Novel steroidal pure antiestrogens." Steroids **54**(1): 71-99.
- Boyd, S. (1900). "On oophorectomy in cancer of the breast." Br. Med. J.(2): 5.
- Braith, F., *et al.* (2008). "Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers." Clinical Cancer Research **14**(19): 6296-6301.
- Breasted, J. H. (1930). The Edwin Smith Surgical Papyrus. Birmingham, AL, University of Chicago Press. Reprint.
- Bronagh, M., *et al.* (1997). "Hormonal therapy of breast cancer : State of the art." Oncology **11**(5): 7.
- Brzozowski, A. M., *et al.* (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." Nature **389**(6652): 753-758.
- Buchwald, M., *et al.* (2009). "HDACi--targets beyond chromatin." Cancer Letters **280**(2): 160-167.
- Bunone, G., *et al.* (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." EMBO Journal **15**(9): 2174-2183.
- Buzdar, A. U. (2002). "Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy." J Clin Oncol **20**(3): 876-878.

- Byrd, J. C., *et al.* (2005). "A phase 1 and pharmacodynamic study of depsipeptide (FK228) in chronic lymphocytic leukemia and acute myeloid leukemia." Blood **105**(3): 959-967.
- Callige, M., *et al.* (2005). "CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome." Mol Cell Biol **25**(11): 4349-4358.
- Camacho, L. H., *et al.* (2007). "Phase I dose escalation clinical trial of phenylbutyrate sodium administered twice daily to patients with advanced solid tumors." Investigational New Drugs **25**(2): 131-138.
- Canutescu, A. A., *et al.* (2003). "A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction." Protein Sci **12**(9): 2001-2014.
- Cariou, S., *et al.* (2000). "Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(16): 9042-9046.
- Carroll, J. S., *et al.* (2005). "Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1." Cell **122**(1): 33-43.
- Carroll, J. S., *et al.* (2006). "Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites." Nat Genet **38**(11): 1289-1297.
- Carroll, J. S., *et al.* (2006). "Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites." Nature Genetics **38**(11): 1289-1297.
- Carroll, J. S., *et al.* (2000). "A pure estrogen antagonist inhibits cyclin E-Cdk2 activity in MCF-7 breast cancer cells and induces accumulation of p130-E2F4 complexes characteristic of quiescence." Journal of Biological Chemistry **275**(49): 38221-38229.
- Cavalieri, E. L., *et al.* (1997). "Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10937-10942.
- Chakravarti, D., *et al.* (1996). "Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling." Nature **383**(6595): 99-103.
- Chandler, V. L., *et al.* (1983). "DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo." Cell **33**(2): 489-499.
- Chang, E. C., *et al.* (2006). "Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells." Endocrinology **147**(10): 4831-4842.
- Chen, C. S., *et al.* (2007). "Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation." Cancer Research **67**(11): 5318-5327.
- Chen, D., *et al.* (1999). "Regulation of transcription by a protein methyltransferase." Science **284**(5423): 2174-2177.
- Chen, H., *et al.* (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." Cell **98**(5): 675-686.
- Chen, L., *et al.* (2001). "Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation." Science **293**(5535): 1653-1657.

- Cheng, Y. C., *et al.* (2007). "Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia." Leuk Res **31**(10): 1403-1411.
- Choo, Y., *et al.* (1994). "Selection of DNA binding sites for zinc fingers using rationally randomized DNA reveals coded interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11168-11172.
- Choo, Y., *et al.* (1994). "Toward a code for the interactions of zinc fingers with DNA: selection of randomized fingers displayed on phage." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 11163-11167.
- Choo, Y., *et al.* (1997). "Physical basis of a protein-DNA recognition code." Curr Opin Struct Biol **7**(1): 117-125.
- Chou, T. C., *et al.* (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." Adv Enzyme Regul **22**: 27-55.
- Chusacultanachai, S., *et al.* (1999). "Analysis of estrogen response element binding by genetically selected steroid receptor DNA binding domain mutants exhibiting altered specificity and enhanced affinity." J Biol Chem **274**(33): 23591-23598.
- Ciocca, D. R., *et al.* (1995). "Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications." Endocrine Reviews **16**(1): 35-62.
- Clarke, R. (2000). "Introduction and overview: sex steroids in the mammary gland." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(3): 245-250.
- Cohen, H. Y., *et al.* (2004). "Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis." Mol Cell **13**(5): 627-638.
- Cole, M. P., *et al.* (1971). "A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474." British Journal of Cancer **25**(2): 270-275.
- Comité directeur de la Société canadienne du cancer (2010). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*. Toronto, Canada, Société canadienne du cancer.
- Contreras-Moreira, B., *et al.* (2007). "TFmodeller: comparative modelling of protein-DNA complexes." Bioinformatics **23**(13): 1694-1696.
- Couse, J. F., *et al.* (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" Endocrine Reviews **20**(3): 358-417.
- Couse, J. F., *et al.* (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" Endocr Rev **20**(3): 358-417.
- Cowley, S. M., *et al.* (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." Journal of Biological Chemistry **272**(32): 19858-19862.
- Currie, L. J., *et al.* (2004). "Postmenopausal estrogen use affects risk for Parkinson disease." Archives of Neurology **61**(6): 886-888.
- Curtis, S. H., *et al.* (2000). "Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo." Advances in Pharmacology **47**: 357-380.
- D'Alessio, A. C., *et al.* (2007). "Acetylation-induced transcription is required for active DNA demethylation in methylation-silenced genes." Molecular and Cellular Biology **27**(21): 7462-7474.



- Dana, S. L., *et al.* (1994). "Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells." Mol Endocrinol **8**(9): 1193-1207.
- Daniel, C. W., *et al.* (1987). "Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography." Cancer Res **47**(22): 6052-6057.
- Dauvois, S., *et al.* (1992). "Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 4037-4041.
- Dauvois, S., *et al.* (1993). "The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling." J Cell Sci **106** ( Pt 4): 1377-1388.
- de Jong, M. M., *et al.* (2002). "Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility." J Med Genet **39**(4): 225-242.
- deFazio, A., *et al.* (1992). "Effect of sodium butyrate on estrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines." J Biol Chem **267**(25): 18008-18012.
- DeMeo, S. D., *et al.* (2008). "Specificity of DNA-binding by the FAX-1 and NHR-67 nuclear receptors of *Caenorhabditis elegans* is partially mediated via a subclass-specific P-box residue." BMC Mol Biol **9**: 2.
- Denger, S., *et al.* (2001). "Tissue-specific expression of human ERalpha and ERbeta in the male." Molecular and Cellular Endocrinology **178**(1-2): 155-160.
- Denger, S., *et al.* (2001). "ER{alpha} Gene Expression in Human Primary Osteoblasts: Evidence for the Expression of Two Receptor Proteins." Molecular Endocrinology **15**(12): 2064-2077.
- Deschenes, J., *et al.* (2007). "Regulation of GREB1 transcription by estrogen receptor alpha through a multipartite enhancer spread over 20 kb of upstream flanking sequences." J Biol Chem **282**(24): 17335-17339.
- Donaghue, C., *et al.* (1999). "Selective promoter usage of the human estrogen receptor-alpha gene and its regulation by estrogen." Molecular Endocrinology **13**(11): 1934-1950.
- Douglas, P. S., *et al.* (1998). "Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload." Journal of the American College of Cardiology **32**(4): 1118-1125.
- Driscoll, M. D., *et al.* (1998). "Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements." Journal of Biological Chemistry **273**(45): 29321-29330.
- Du, B. O., M. Takahashi, K. Kawagoe, J. Oshima, C. Igarashi, H. Mori-abe, A. Saitoh, M. Ohta, T. Ohishi, A. Doshida, M. Tezuka, N. Takahashi, T. Kuachi, H. (2004). "Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade." J Endocrinol **183**(3): 605-615.
- Dukes, M., *et al.* (1993). "Antiuterotrophic effects of the pure antioestrogen ICI 182,780 in adult female monkeys (*Macaca nemestrina*): quantitative magnetic resonance imaging." J Endocrinol **138**(2): 203-210.

- Dutertre, M., *et al.* (2003). "Ligand-Independent Interactions of p160/Steroid Receptor Coactivators and CREB-Binding Protein (CBP) with Estrogen Receptor- $\alpha$ : Regulation by Phosphorylation Sites in the A/B Region Depends on Other Receptor Domains." Molecular Endocrinology **17**(7): 1296-1314.
- Duvic, M., *et al.* (2007). "Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)." Blood **109**(1): 31-39.
- Edwards, A., *et al.* (2007). "Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells." Molecular Cancer Therapeutics **6**(9): 9.
- Edwards, A., *et al.* (2007). "Effect of the histone deacetylase inhibitor LBH589 against epidermal growth factor receptor-dependent human lung cancer cells." Mol Cancer Ther **6**(9): 2515-2524.
- Edwards, D. P. (2000). "The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(3): 307-324.
- Egner, U., *et al.* (2001). "Different ligands-different receptor conformations: modeling of the hER  $\alpha$  LBD in complex with agonists and antagonists." Medicinal Research Reviews **21**(6): 523-539.
- Endoh, H., *et al.* (1999). "Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ ." Molecular and Cellular Biology **19**(8): 5363-5372.
- Fan, J., *et al.* (2008). "ER  $\alpha$  negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **134**(8): 883-890.
- Fan, J., *et al.* (2008). "ER  $\alpha$  negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor." J Cancer Res Clin Oncol **134**(8): 883-890.
- Farhat, M. Y., *et al.* (1993). "Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats." British Journal of Pharmacology **110**(2): 719-723.
- Faulds, M. H., *et al.* (2004). "Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells." Molecular Endocrinology **18**(2): 412-421.
- Ferguson, A. T., *et al.* (1995). "Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression." Cancer Res **55**(11): 2279-2283.
- Filardo, E. J., *et al.* (2005). "GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release." Trends Endocrinol Metab **16**(8): 362-367.
- Finnin, M. S., *et al.* (1999). "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors." Nature **401**(6749): 188-193.
- Fiorelli, G., *et al.* (1996). "Membrane binding sites and non-genomic effects of estrogen in cultured human pre-osteoclastic cells." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **59**(2): 233-240.

- Fisher, B., *et al.* (2002). "Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer." N Engl J Med **347**(16): 1233-1241.
- Fisher, B., *et al.* (1985). "Five-year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer." New England Journal of Medicine(312): 8.
- Fisher, B., *et al.* (1994). "Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14." Journal of the National Cancer Institute (1988) **86**(7): 527-537.
- Fisher, B., *et al.* (1998). "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." J Natl Cancer Inst **90**(18): 1371-1388.
- Fisher, C. R., *et al.* (1998). "Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6965-6970.
- Fiskus, W., *et al.* (2007). "Hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitors attenuate estrogen receptor-alpha levels and transcriptional activity: a result of hyperacetylation and inhibition of chaperone function of heat shock protein 90." Clinical Cancer Research **13**(16): 4882-4890.
- Fiskus, W., *et al.* (2007). "Hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitors attenuate estrogen receptor-alpha levels and transcriptional activity: a result of hyperacetylation and inhibition of chaperone function of heat shock protein 90." Clin Cancer Res **13**(16): 4882-4890.
- Fondell, J. D., *et al.* (1996). "Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(16): 8329-8333.
- Fouladi, M., *et al.* (2006). "Phase I study of depsipeptide in pediatric patients with refractory solid tumors: a Children's Oncology Group report." Journal of Clinical Oncology **24**(22): 3678-3685.
- Freedman, L. P. (1992). "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region." Endocrine Reviews **13**(2): 129-145.
- Freedman, M., *et al.* (2001). "Digitized mammography: a clinical trial of postmenopausal women randomly assigned to receive raloxifene, estrogen, or placebo." Journal of the National Cancer Institute (1988) **93**(1): 51-56.
- Freiman, R. N., *et al.* (2003). "Regulating the regulators: lysine modifications make their mark." Cell **112**(1): 11-17.
- Frew, A. J., *et al.* (2009). "Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors." Cancer Letters **280**(2): 125-133.
- Fryer, C. J., *et al.* (1998). "Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex." Nature **393**(6680): 88-91.
- Gabrielli, B. G., *et al.* (2002). "Identifying molecular targets mediating the anticancer activity of histone deacetylase inhibitors: a work in progress." Curr Cancer Drug Targets **2**(4): 337-353.

- Galien, R., *et al.* (1997). "Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site." Nucleic Acids Res **25**(12): 2424-2429.
- Gao, L., *et al.* (2002). "Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family." J Biol Chem **277**(28): 25748-25755.
- Garcia-Segura, L. M., *et al.* (2001). "Neuroprotection by estradiol." Progress in Neurobiology **63**(1): 29-60.
- Gaughan, L., *et al.* (2002). "Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor." J Biol Chem **277**(29): 25904-25913.
- Giamarchi, C., *et al.* (2002). "Two antiestrogens affect differently chromatin remodeling of trefoil factor 1 (pS2) gene and the fate of estrogen receptor in MCF7 cells." Biochim Biophys Acta **1578**(1-3): 12-20.
- Glaser, K. B. (2007). "HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential." Biochem Pharmacol **74**(5): 659-671.
- Glaser, K. B., *et al.* (2003). "Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA." Biochemical and Biophysical Research Communications **310**(2): 529-536.
- Glaser, K. B., *et al.* (2003). "Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines." Molecular Cancer Therapeutics **2**(2): 151-163.
- Glozak, M. A., *et al.* (2005). "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins." Gene **363**: 15-23.
- Gooren, L. J., *et al.* (2003). "Significance of oestrogens in male (patho)physiology." Ann Endocrinol (Paris) **64**(2): 126-135.
- Gottardis, M. M., *et al.* (1988). "Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse." Cancer Research **48**(4): 812-815.
- Gottlieb, B., *et al.* (2004). "The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update." Hum Mutat **23**(6): 527-533.
- Grandien, K. F., *et al.* (1993). "Localization of DNase I hypersensitive sites in the human oestrogen receptor gene correlates with the transcriptional activity of two differentially used promoters." Journal of Molecular Endocrinology **10**(3): 269-277.
- Grant, S., *et al.* (2007). "Vorinostat." Nature Reviews. Drug Discovery **6**(1): 21-22.
- Green, K. A., *et al.* (2007). "Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state." Nature Reviews Cancer **7**(9): 713-722.
- Green, P. S., *et al.* (2000). "Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action." International Journal of Developmental Neuroscience **18**(4-5): 347-358.
- Green, S., *et al.* (1986). "Cloning of the human oestrogen receptor cDNA." Journal of Steroid Biochemistry **24**(1): 77-83.
- Green, S., *et al.* (1986). "Cloning of the human oestrogen receptor cDNA." J Steroid Biochem **24**(1): 77-83.

- Greene, G. L., *et al.* (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-1154.
- Greisman, H. A., *et al.* (1997). "A general strategy for selecting high-affinity zinc finger proteins for diverse DNA target sites." Science **275**(5300): 657-661.
- Grese, T. A., *et al.* (1997). "Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(25): 14105-14110.
- Gruber, C. J., *et al.* (2004). "Anatomy of the estrogen response element." Trends in Endocrinology and Metabolism **15**(2): 73-78.
- Gu, W., *et al.* (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." Cell **90**(4): 595-606.
- Gui, C. Y., *et al.* (2004). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1241-1246.
- Gustafsdottir, S. M., *et al.* (2007). "In vitro analysis of DNA-protein interactions by proximity ligation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3067-3072.
- Guzzo, J. A. (2000). "Selective estrogen receptor modulators--a new age of estrogens in cardiovascular disease?" Clin Cardiol **23**(1): 15-17.
- Haggarty, S. J., *et al.* (2003). "Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(8): 4389-4394.
- Hahn, W. C., *et al.* (2002). "Rules for making human tumor cells." New England Journal of Medicine **347**(20): 1593-1603.
- Halberstaeder, I., *et al.* (1946). "The artificial menopause and cancer of the breast." J. Am. Med. Assoc(131): 6.
- Hall, J. M., *et al.* (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology **140**(12): 5566-5578.
- Hanahan, D., *et al.* (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hao, J., *et al.* (2003). "Estrogen increases the number of spinophilin-immunoreactive spines in the hippocampus of young and aged female rhesus monkeys." Journal of Comparative Neurology **465**(4): 540-550.
- Hard, T., *et al.* (1990). "Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain." Science **249**(4965): 157-160.
- Havelock, J. C., *et al.* (2004). "Ovarian granulosa cell lines." Mol Cell Endocrinol **228**(1-2): 67-78.
- Heldring, N., *et al.* (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiological Reviews **87**(3): 905-931.
- Heldring, N., *et al.* (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Ho, S. W., *et al.* (2006). "Linking DNA-binding proteins to their recognition sequences by using protein microarrays." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9940-9945.

- Hodges-Gallagher, L., *et al.* (2008). "Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **109**(2): 241-250.
- Hodin, R. A., *et al.* (1989). "Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific." Science **244**(4900): 76-79.
- Hopp, T. A., *et al.* (2004). "Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer." Clin Cancer Res **10**(22): 7490-7499.
- Howell, A., *et al.* (2005). "Clinical development of fulvestrant ("Faslodex")." Cancer Treat Rev **31 Suppl 2**: S3-9.
- Howell, A., *et al.* (2005). "Clinical development of fulvestrant ("Faslodex")." Cancer Treatment Reviews **31 Suppl 2**: S3-9.
- Howell, A., *et al.* (1996). "Pharmacokinetics, pharmacological and anti-tumour effects of the specific anti-oestrogen ICI 182780 in women with advanced breast cancer." British Journal of Cancer **74**(2): 300-308.
- Howell, A., *et al.* (2000). "ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen." Cancer **89**(4): 817-825.
- Htun, H., *et al.* (1999). "Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor." Mol Biol Cell **10**(2): 471-486.
- Htun, H., *et al.* (1999). "Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor." Molecular Biology of the Cell **10**(2): 471-486.
- Hu, X. F., *et al.* (1993). "Circumvention of tamoxifen resistance by the pure anti-estrogen ICI 182,780." International Journal of Cancer **55**(5): 873-876.
- Huang, B. H., *et al.* (2005). "Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1." Cell Death and Differentiation **12**(4): 395-404.
- Hubbert, C., *et al.* (2002). "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." Nature **417**(6887): 455-458.
- Hulka, B. S. (1996). "Epidemiology of susceptibility to breast cancer." Prog Clin Biol Res **395**: 159-174.
- Hulka, B. S., *et al.* (2001). "Breast cancer: hormones and other risk factors." Maturitas **38**(1): 103-113; discussion 113-106.
- Huq, M. D., *et al.* (2005). "Post-translational modification of nuclear co-repressor receptor-interacting protein 140 by acetylation." Mol Cell Proteomics **4**(7): 975-983.
- Imai, S., *et al.* (2000). "Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase." Nature **403**(6771): 795-800.
- Inche, A. G., *et al.* (2006). "Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise." Drug Discov Today **11**(3-4): 97-109.
- Inoue, S., *et al.* (2007). "Apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in leukemic cells is mediated by Bim and Noxa." Leukemia **21**(8): 1773-1782.
- Insinga, A., *et al.* (2005). "Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway." Natural Medicines **11**(1): 71-76.

- Issa, J. P., *et al.* (1996). "The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms." Cancer Research **56**(5): 973-977.
- Itazaki, H., *et al.* (1990). "Isolation and structural elucidation of new cyclotetrapeptides, trapoxins A and B, having detransformation activities as antitumor agents." J Antibiot (Tokyo) **43**(12): 1524-1532.
- Ito, A., *et al.* (2002). "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation." EMBO Journal **21**(22): 6236-6245.
- Iwase, H., *et al.* (2003). "Clinical significance of the expression of estrogen receptors alpha and beta for endocrine therapy of breast cancer." Cancer Chemother Pharmacol **52 Suppl 1**: S34-38.
- Iyer, N. G., *et al.* (2004). "p300/CBP and cancer." Oncogene **23**(24): 4225-4231.
- Jaffe, A. B., *et al.* (1994). "Estrogen regulates metabolism of Alzheimer amyloid beta precursor protein." Journal of Biological Chemistry **269**(18): 13065-13068.
- Jakacka, M., *et al.* (2001). "Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway." J Biol Chem **276**(17): 13615-13621.
- Jamieson, A. C., *et al.* (1994). "In vitro selection of zinc fingers with altered DNA-binding specificity." Biochemistry **33**(19): 5689-5695.
- Jamieson, A. C., *et al.* (2003). "Drug discovery with engineered zinc-finger proteins." Nat Rev Drug Discov **2**(5): 361-368.
- Jang, E. R., *et al.* (2004). "The histone deacetylase inhibitor trichostatin A sensitizes estrogen receptor alpha-negative breast cancer cells to tamoxifen." Oncogene **23**(9): 1724-1736.
- Jensen, E. D., *et al.* (2007). "Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **17**(3): 187-196.
- Jensen, E. V., *et al.* (1962). "Basic guides to the mechanism of estrogen action." Recent Progress in Hormone Research(18): 387-414.
- Jensen, E. V., *et al.* (1969). "Estrogen-binding substances of target tissues." Steroids **13**(4): 417-427.
- Jeppesen, P., *et al.* (1993). "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression." Cell **74**(2): 281-289.
- Jin, V. X., *et al.* (2004). "Identifying estrogen receptor alpha target genes using integrated computational genomics and chromatin immunoprecipitation microarray." Nucleic Acids Res **32**(22): 6627-6635.
- Joel, P. B., *et al.* (1998). "pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167." Molecular and Cellular Biology **18**(4): 1978-1984.
- Joel, P. B., *et al.* (1998). "Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase." Journal of Biological Chemistry **273**(21): 13317-13323.
- Johnston, S. R. (1997). "Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications." Anti-Cancer Drugs **8**(10): 911-930.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." Nat Rev Drug Discov **1**(4): 287-299.

- Johnstone, R. W., *et al.* (2003). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target?" Cancer Cell **4**(1): 13-18.
- Jordan, V. C. (2003). "Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents." J Med Chem **46**(7): 1081-1111.
- Jordan, V. C. (2003). "Is Tamoxifen the Rosetta Stone for Breast Cancer?" JNCI Cancer Spectrum **95**(5): 338-340.
- Jordan, V. C., *et al.* (1982). "Importance of the alkylaminoethoxy side-chain for the estrogenic and antiestrogenic actions of tamoxifen and trioxifene in the immature rat uterus." Molecular and Cellular Endocrinology **27**(3): 291-306.
- Josephy, P. D. (1997). "Re: Feigelson, H.S. and Henderson, B.E. (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 17, 2279-2284." Carcinogenesis **18**(9): 1859-1860.
- Kahlen, J. P., *et al.* (1997). "Allosteric interaction of the 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and the retinoid X receptor on DNA." Nucleic Acids Res **25**(21): 4307-4313.
- Kameda, T., *et al.* (1997). "Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts." J Exp Med **186**(4): 489-495.
- Kamei, Y., *et al.* (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-414.
- Kastner, P., *et al.* (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." EMBO Journal **9**(5): 1603-1614.
- Kato, S., *et al.* (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-1494.
- Katzenellenbogen, J. A., *et al.* (1996). "Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones." Mol Endocrinol **10**(2): 119-131.
- Kawai, H., *et al.* (2003). "Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha." International Journal of Cancer **107**(3): 353-358.
- Kawai, H., *et al.* (2003). "Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha." Int J Cancer **107**(3): 353-358.
- Kedar, R. P., *et al.* (1994). "Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention trial." Lancet **343**(8909): 1318-1321.
- Kelly, W. K., *et al.* (2005). "Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid." Nat Clin Pract Oncol **2**(3): 150-157.
- Kelly, W. K., *et al.* (2005). "Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer." Journal of Clinical Oncology **23**(17): 3923-3931.



- Kelly, W. K., *et al.* (2005). "Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer." J Clin Oncol **23**(17): 3923-3931.
- Kelly, W. K., *et al.* (2002). "Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials." Expert Opin Investig Drugs **11**(12): 1695-1713.
- Kelly, W. K., *et al.* (2003). "Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously." Clinical Cancer Research **9**(10 Pt 1): 3578-3588.
- Key, T. J. A., *et al.* (1984). "The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer." Eur J Cancer Clin Oncol(24): 14.
- Kim, M. S., *et al.* (2001). "Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes." Natural Medicines **7**(4): 437-443.
- Kim, M. Y., *et al.* (2006). "Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor." Mol Endocrinol **20**(7): 1479-1493.
- Kim, M. Y., *et al.* (2006). "Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor." Molecular Endocrinology **20**(7): 1479-1493.
- Kim, S. H., *et al.* (2010). "Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein." Breast Cancer Research **12**(2): R22.
- Kim, S. H., *et al.* (2010). "Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein." Breast Cancer Res **12**(2): R22.
- Kim, Y. B., *et al.* (1999). "Oxamflatin is a novel antitumor compound that inhibits mammalian histone deacetylase." Oncogene **18**(15): 2461-2470.
- Klein-Hitpass, L., *et al.* (1986). "An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells." Cell **46**(7): 1053-1061.
- Klimek, V. M., *et al.* (2008). "Tolerability, pharmacodynamics, and pharmacokinetics studies of depsipeptide (romidepsin) in patients with acute myelogenous leukemia or advanced myelodysplastic syndromes." Clinical Cancer Research **14**(3): 826-832.
- Klinge, C. M. (1999). "Role of estrogen receptor ligand and estrogen response element sequence on interaction with chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)." J Steroid Biochem Mol Biol **71**(1-2): 1-19.
- Klinge, C. M. (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." Nucleic Acids Res **29**(14): 2905-2919.
- Klinge, C. M., *et al.* (1996). "Dissociation of 4-hydroxytamoxifen, but not estradiol or tamoxifen aziridine, from the estrogen receptor as the receptor binds estrogen response element DNA." J Steroid Biochem Mol Biol **57**(1-2): 51-66.
- Koelle, M. R., *et al.* (1991). "The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily." Cell **67**(1): 59-77.

- Komatsu, N., *et al.* (2006). "SAHA, a HDAC inhibitor, has profound anti-growth activity against non-small cell lung cancer cells." *Oncol Rep* **15**(1): 187-191.
- Kos, M., *et al.* (2001). "Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region." *Mol Endocrinol* **15**(12): 2057-2063.
- Kousteni, S., *et al.* (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." *Cell* **104**(5): 719-730.
- Kovacs, J. J., *et al.* (2005). "HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor." *Mol Cell* **18**(5): 601-607.
- Kow, L. M., *et al.* (1998). "Mapping of neural and signal transduction pathways for lordosis in the search for estrogen actions on the central nervous system." *Behavioural Brain Research* **92**(2): 169-180.
- Krege, J. H., *et al.* (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(26): 15677-15682.
- Krege, J. H., *et al.* (1998). "Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15677-15682.
- Krishnan, V., *et al.* (1994). "Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells." *Journal of Biological Chemistry* **269**(22): 15912-15917.
- Kuiper, G. G., *et al.* (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-870.
- Kuiper, G. G., *et al.* (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(12): 5925-5930.
- Kuiper, G. G., *et al.* (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-5930.
- Kuiper, G. G., *et al.* (1998). "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems." *Front Neuroendocrinol* **19**(4): 253-286.
- Kuiper, G. G., *et al.* (1998). "The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems." *Frontiers in Neuroendocrinology* **19**(4): 253-286.
- Kulakosky, P. C., *et al.* (2002). "Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity." *J Mol Endocrinol* **29**(1): 137-152.
- Kummar, S., *et al.* (2007). "Phase I trial of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, administered weekly in refractory solid tumors and lymphoid malignancies." *Clinical Cancer Research* **13**(18 Pt 1): 5411-5417.
- Kushner, P. J., *et al.* (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 311-317.
- Kwon, H. J., *et al.* (2002). "Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis." *International Journal of Cancer* **97**(3): 290-296.
- Lacassagne, A. (1936). "Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast." *Am. J. Cancer* (27): 9.

- Lafon-Hughes, L., *et al.* (2008). "Chromatin-remodelling mechanisms in cancer." Mutation Research **658**(3): 191-214.
- Laganier, J., *et al.* (2005). "From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(33): 11651-11656.
- Lane, A. A., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." J Clin Oncol **27**(32): 5459-5468.
- Lane, A. A., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy." Journal of Clinical Oncology **27**(32): 5459-5468.
- Laron, Z., *et al.* (1989). "Clinical evidence on the role of estrogens in the development of the breasts." Proc R Soc Edinburgh B1(95): 9.
- Lathrop, A. E. C. L., L. (1916). "Further investigations on the origins of tumors in mice. III. On the part played by internal secretions in the spontaneous development of tumors." J. Cancer Res.(1): 16.
- Lavinsky, R. M., *et al.* (1998). "Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(6): 2920-2925.
- Le Goff, P., *et al.* (1994). "Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity." Journal of Biological Chemistry **269**(6): 4458-4466.
- Leder, A., *et al.* (1975). "Differentiation of erythroleukemic cells in the presence of inhibitors of DNA synthesis." Science **190**(4217): 893-894.
- Lee, D. Y., *et al.* (1993). "A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA." Cell **72**(1): 73-84.
- Leong, H., *et al.* (2005). "Recruitment of histone deacetylase 4 to the N-terminal region of estrogen receptor alpha." Mol Endocrinol **19**(12): 2930-2942.
- Leranth, C., *et al.* (2000). "Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory." Journal of Neuroscience **20**(23): 8604-8609.
- Lerner, L. J. (1981). Non-steroidal Anti-oestrogens: Molecular Pharmacology and Antitumour Activity. Sydney, Sydney Academic Press.
- Lerner, L. J., *et al.* (1958). "A nonsteroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenylethanol." Endocrinology(63): 24.
- Lerner, L. J., *et al.* (1990). "Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture." Cancer Research **50**(14): 4177-4189.
- Li, A. G., *et al.* (2007). "An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment." Mol Cell **28**(3): 408-421.
- Li, A. G., *et al.* (2007). "An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment." Molecular Cell **28**(3): 408-421.
- Li, R., *et al.* (2005). "Estrogen and brain: synthesis, function and diseases." Front Biosci **10**: 257-267.

- Lin, C. Y., *et al.* (2004). "Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells." Genome Biology **5**(9): R66.
- Lin, C. Y., *et al.* (2007). "Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites." PLoS Genet **3**(6): e87.
- Lindberg, M. K., *et al.* (2003). "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." Molecular Endocrinology **17**(2): 203-208.
- Lindberg, M. K., *et al.* (2003). "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." Mol Endocrinol **17**(2): 203-208.
- Liu, M. M., *et al.* (2002). "Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression." Journal of Biological Chemistry **277**(27): 24353-24360.
- Lombardi, G., *et al.* (2001). "Estrogens and health in males." Mol Cell Endocrinol **178**(1-2): 51-55.
- Lubahn, D. B., *et al.* (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11162-11166.
- Lubahn, D. B., *et al.* (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(23): 11162-11166.
- Luine, V. N. (1985). "Estradiol increases choline acetyltransferase activity in specific basal forebrain nuclei and projection areas of female rats." Experimental Neurology **89**(2): 484-490.
- Luisi, B. F., *et al.* (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." Nature **352**(6335): 497-505.
- Lund, A. H., *et al.* (2004). "Epigenetics and cancer." Genes & Development **18**(19): 2315-2335.
- Lundeen, S. G., *et al.* (1997). "Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels." Endocrinology **138**(4): 1552-1558.
- Luu, T. H., *et al.* (2008). "A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study." Clinical Cancer Research **14**(21): 7138-7142.
- Luu, T. H., *et al.* (2008). "A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study." Clin Cancer Res **14**(21): 7138-7142.
- Ma, X., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials." Drugs **69**(14): 1911-1934.
- MacGregor, J. I., *et al.* (1998). "Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action." Pharmacological Reviews **50**(2): 151-196.
- MacMahon, B., *et al.* (1973). "Etiology of human breast cancer: a review." J Natl Cancer Inst **50**(1): 21-42.
- Mader, S., *et al.* (1993). "Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain." Nucleic Acids Res **21**(5): 1125-1132.

- Mader, S., *et al.* (1993). "The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains." EMBO Journal **12**(13): 5029-5041.
- Mader, S., *et al.* (1993). "The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains." Embo J **12**(13): 5029-5041.
- Mader, S., *et al.* (1989). "Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element." Nature **338**(6212): 271-274.
- Mahlknecht, U., *et al.* (2000). "Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease." Mol Med **6**(8): 623-644.
- Mann, B. S., *et al.* (2007). "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." Oncologist **12**(10): 1247-1252.
- Mann, B. S., *et al.* (2007). "Vorinostat for treatment of cutaneous manifestations of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." Clin Cancer Res **13**(8): 2318-2322.
- Mann, S., *et al.* (2001). "Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer." Hum Pathol **32**(1): 113-118.
- Marabotti, A., *et al.* (2007). "New computational strategy to analyze the interactions of ERalpha and ERbeta with different ERE sequences." J Comput Chem **28**(6): 1031-1041.
- Marchion, D., *et al.* (2007). "Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment." Expert Rev Anticancer Ther **7**(4): 583-598.
- Margueron, R., *et al.* (2004). "Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens." Journal of Molecular Endocrinology **32**(2): 583-594.
- Margueron, R., *et al.* (2004). "Histone deacetylase inhibition and estrogen receptor alpha levels modulate the transcriptional activity of partial antiestrogens." J Mol Endocrinol **32**(2): 583-594.
- Marks, P., *et al.* (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." Nat Rev Cancer **1**(3): 194-202.
- Marks, P. A. (2007). "Discovery and development of SAHA as an anticancer agent." Oncogene **26**(9): 1351-1356.
- Marks, P. A., *et al.* (2007). "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." Nat Biotechnol **25**(1): 84-90.
- Marks, P. A., *et al.* (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." J Natl Cancer Inst **92**(15): 1210-1216.
- Marmorstein, R., *et al.* (2001). "Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis." Current Opinion in Genetics & Development **11**(2): 155-161.
- Marquez, D. C., *et al.* (2001). "Membrane-associated binding sites for estrogen contribute to growth regulation of human breast cancer cells." Oncogene **20**(39): 5420-5430.
- Marsaud, V., *et al.* (2003). "Various Phosphorylation Pathways, Depending on Agonist and Antagonist Binding to Endogenous Estrogen Receptor {alpha}

- (ER $\alpha$ ), Differentially Affect ER $\alpha$  Extractability, Proteasome-Mediated Stability, and Transcriptional Activity in Human Breast Cancer Cells." Mol Endocrinol **17**(10): 2013-2027.
- Martin, C., *et al.* (2005). "The diverse functions of histone lysine methylation." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(11): 838-849.
- Martinez-Balbas, M. A., *et al.* (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." EMBO J **19**(4): 662-671.
- Matsuda, K., *et al.* (2008). "Intranuclear mobility of estrogen receptor alpha and progesterone receptors in association with nuclear matrix dynamics." J Cell Biochem **103**(1): 136-148.
- Matsuda, K., *et al.* (2008). "Intranuclear mobility of estrogen receptor alpha and progesterone receptors in association with nuclear matrix dynamics." Journal of Cellular Biochemistry **103**(1): 136-148.
- Matthews, B. W. (1988). "Protein-DNA interaction. No code for recognition." Nature **335**(6188): 294-295.
- Matthews, J., *et al.* (2006). "Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters." Mol Endocrinol **20**(3): 534-543.
- McClelland, R. A., *et al.* (2001). "Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex)." Endocrinology **142**(7): 2776-2788.
- McClelland, R. A., *et al.* (1996). "Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes." Breast Cancer Research and Treatment **41**(1): 31-41.
- McClelland, R. A., *et al.* (1996). "Effects of short-term antiestrogen treatment of primary breast cancer on estrogen receptor mRNA and protein expression and on estrogen-regulated genes." Breast Cancer Res Treat **41**(1): 31-41.
- McGee-Lawrence, M. E., *et al.* (2011). "Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; vorinostat) causes bone loss by inhibiting immature osteoblasts." Bone **48**(5): 1117-1126.
- McGee-Lawrence, M. E., *et al.* (2011). "Histone deacetylases in skeletal development and bone mass maintenance." Gene **474**(1-2): 1-11.
- McHugh, N. A., *et al.* (1995). "Ischemia- and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in dogs: effects of estrogen." American Journal of Physiology **268**(6 Pt 2): H2569-2573.
- Mendelsohn, M. E. (2000). "Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **74**(5): 337-343.
- Metivier, R., *et al.* (2003). "Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter." Cell **115**(6): 751-763.
- Migliaccio, A., *et al.* (1993). "Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells." Oncogene **8**(8): 2183-2191.

- Miller, J. C., *et al.* (2001). "Rearrangement of side-chains in a Zif268 mutant highlights the complexities of zinc finger-DNA recognition." J Mol Biol **313**(2): 309-315.
- Mitsiades, C. S., *et al.* (2004). "Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(2): 540-545.
- Modesitt, S. C., *et al.* (2008). "A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study." Gynecol Oncol **109**(2): 182-186.
- Modesitt, S. C., *et al.* (2008). "A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study." Gynecologic Oncology **109**(2): 182-186.
- Moggs, J. G., *et al.* (2001). "Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses." EMBO Rep **2**(9): 775-781.
- Moriarty, K., *et al.* (2006). "Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling." Endocrinology **147**(12): 5557-5563.
- Mosselman, S., *et al.* (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Letters **392**(1): 49-53.
- Mujtaba, S., *et al.* (2004). "Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation." Molecular Cell **13**(2): 251-263.
- Munster, P. N., *et al.* (2001). "The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces differentiation of human breast cancer cells." Cancer Res **61**(23): 8492-8497.
- Murphy, L. C., *et al.* (2005). "Inducible upregulation of oestrogen receptor-beta1 affects oestrogen and tamoxifen responsiveness in MCF7 human breast cancer cells." J Mol Endocrinol **34**(2): 553-566.
- Murphy, L. C., *et al.* (2006). "Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer in vivo." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 139-146.
- Nadiminty, N., *et al.* (2006). "Stat3 activation of NF- $\kappa$ B p100 processing involves CBP/p300-mediated acetylation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(19): 7264-7269.
- Nakao, M. (2001). "Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin." Gene **278**(1-2): 25-31.
- Nan, X., *et al.* (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." Nature **393**(6683): 386-389.
- Nardulli, A. M., *et al.* (1996). "Estrogen receptor affinity and location of consensus and imperfect estrogen response elements influence transcription activation of simplified promoters." Mol Endocrinol **10**(6): 694-704.
- Nathan, L., *et al.* (1997). "Estrogens and atherosclerosis." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **37**: 477-515.

- Nawaz, Z., *et al.* (1999). "Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(5): 1858-1862.
- Nguyen, D., *et al.* (2001). "A G577R mutation in the human AR P box results in selective decreases in DNA binding and in partial androgen insensitivity syndrome." Mol Endocrinol **15**(10): 1790-1802.
- Nickenig, G., *et al.* (1998). "Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo." Circulation **97**(22): 2197-2201.
- Nilsson, S., *et al.* (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-1565.
- Nilsson, S., *et al.* (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiological Reviews **81**(4): 1535-1565.
- Nirmala, P. B., *et al.* (1995). "Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol." Biochemical and Biophysical Research Communications **213**(1): 24-31.
- Node, K., *et al.* (1997). "Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels." Circulation **96**(6): 1953-1963.
- Noh, E. J., *et al.* (2003). "Functional interplay between modulation of histone deacetylase activity and its regulatory role in G2-M transition." Biochem Biophys Res Commun **310**(2): 267-273.
- Nolte, R. T., *et al.* (1998). "Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma." Nature **395**(6698): 137-143.
- O'Lone, R., *et al.* (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." Mol Endocrinol **18**(8): 1859-1875.
- O'Lone, R., *et al.* (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." Molecular Endocrinology **18**(8): 1859-1875.
- Ogawa, S., *et al.* (1998). "Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human." Nucleic Acids Res **26**(15): 3505-3512.
- Oliveira, C. F., *et al.* (2007). Histoire du traitement conservateur du cancer du sein: place de la chirurgie. Traitements loco-régionaux, prise en charge de leurs séquelles, chirurgie réparatrice, chirurgie esthétique.: 821-836.
- Omoto, Y., *et al.* (2003). "Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbetacx/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7." Oncogene **22**(32): 5011-5020.
- Orimo, A., *et al.* (1999). "Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(21): 12027-12032.
- Ormandy, C. J., *et al.* (1992). "Coordinate regulation of oestrogen and prolactin receptor expression by sodium butyrate in human breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **182**(2): 740-745.



- Osborne, C. K. (1998). "Tamoxifen in the treatment of breast cancer." New England Journal of Medicine **339**(22): 1609-1618.
- Osborne, C. K., *et al.* (1995). "Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer." J Natl Cancer Inst **87**(10): 746-750.
- Osborne, C. K., *et al.* (1995). "Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer." Journal of the National Cancer Institute (1988) **87**(10): 746-750.
- Osborne, C. K., *et al.* (1994). "The importance of tamoxifen metabolism in tamoxifen-stimulated breast tumor growth." Cancer Chemother Pharmacol **34**(2): 89-95.
- Ottaviano, Y. L., *et al.* (1994). "Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells." Cancer Research **54**(10): 2552-2555.
- Pabo, C. O., *et al.* (2001). "Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins." Annu Rev Biochem **70**: 313-340.
- Pabo, C. O., *et al.* (1984). "Protein-DNA recognition." Annu Rev Biochem **53**: 293-321.
- Paganini-Hill, A., *et al.* (1996). "Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer disease." Archives of Internal Medicine **156**(19): 2213-2217.
- Palmieri, C., *et al.* (2002). "Estrogen receptor beta in breast cancer." Endocr Relat Cancer **9**(1): 1-13.
- Palmieri, C., *et al.* (2004). "The expression of oestrogen receptor (ER)-beta and its variants, but not ERalpha, in adult human mammary fibroblasts." J Mol Endocrinol **33**(1): 35-50.
- Parker, M. G. (1993). "Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action." Breast Cancer Res Treat **26**(2): 131-137.
- Parkin, D. M. (2004). "International variation." Oncogene **23**(38): 6329-6340.
- Parkin, D. M., *et al.* (1999). "Global cancer statistics." CA: A Cancer Journal for Clinicians **49**(1): 33-64, 31.
- Paruthiyil, S., *et al.* (2004). "Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest." Cancer Res **64**(1): 423-428.
- Patel, J. H., *et al.* (2004). "The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60." Mol Cell Biol **24**(24): 10826-10834.
- Patey, D. H., *et al.* (1948). "The prognosis of carcinoma of the breast in relation to their type of operation performed." British Journal of Cancer(2): 7.
- Peart, M. J., *et al.* (2003). "Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors." Cancer Res **63**(15): 4460-4471.
- Pedram, A., *et al.* (2006). "Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane." Mol Endocrinol **20**(9): 1996-2009.
- Peekhaus, N. T., *et al.* (2004). "Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and -beta in the breast cancer cell line MCF-7." J Mol Endocrinol **32**(3): 987-995.

- Petrella, A., *et al.* (2008). "Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1." European Journal of Cancer **44**(5): 740-749.
- Piedbois, P., *et al.* (2009). "[Fulvestrant use in clinical practice in France: a pharmacoepidemiologic study]." Bull Cancer.
- Pike, A. C., *et al.* (1999). "Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist." EMBO Journal **18**(17): 4608-4618.
- Pinzone, J. J., *et al.* (2004). "Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression." Mol Cell Biol **24**(11): 4605-4612.
- Porter, W., *et al.* (1997). "Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor." Molecular Endocrinology **11**(11): 1569-1580.
- Porter, W., *et al.* (1997). "Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor." Mol Endocrinol **11**(11): 1569-1580.
- Poutanen, M., *et al.* (1995). "Regulation of oestrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." Annals of Medicine **27**(6): 675-682.
- Pratt, W. B., *et al.* (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocrine Reviews **18**(3): 306-360.
- Qian, D. Z., *et al.* (2006). "Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589." Clinical Cancer Research **12**(2): 634-642.
- Qian, X., *et al.* (2008). "Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer." Int J Cancer **122**(6): 1400-1410.
- Qiu, L., *et al.* (2000). "Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells." Mol Biol Cell **11**(6): 2069-2083.
- Rachez, C., *et al.* (1999). "Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex." Nature **398**(6730): 824-828.
- Ramalingam, S. S., *et al.* (2007). "Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies." Clin Cancer Res **13**(12): 3605-3610.
- Raviscioni, M., *et al.* (2005). "Correlated evolutionary pressure at interacting transcription factors and DNA response elements can guide the rational engineering of DNA binding specificity." J Mol Biol **350**(3): 402-415.
- Ray, A., *et al.* (1994). "Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor." Journal of Biological Chemistry **269**(17): 12940-12946.
- Ray, P., *et al.* (1997). "Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor." FEBS Letters **409**(1): 79-85.
- Rebar, E. J., *et al.* (1996). "Phage display methods for selecting zinc finger proteins with novel DNA-binding specificities." Methods Enzymol **267**: 129-149.
- Rebar, E. J., *et al.* (1994). "Zinc finger phage: affinity selection of fingers with new DNA-binding specificities." Science **263**(5147): 671-673.

- Reid, G., *et al.* (2002). "Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation." Cell Mol Life Sci **59**(5): 821-831.
- Reid, G., *et al.* (2003). "Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling." Mol Cell **11**(3): 695-707.
- Reid, G., *et al.* (2003). "Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling." Molecular Cell **11**(3): 695-707.
- Reid, G., *et al.* (2005). "Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A." Oncogene **24**(31): 4894-4907.
- Reinberg, D., *et al.* (1998). "The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future." Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **63**: 83-103.
- Revankar, C. M., *et al.* (2005). "A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling." Science **307**(5715): 1625-1630.
- Revelli, A., *et al.* (1998). "Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues." Endocrine Reviews **19**(1): 3-17.
- Richon, V. M., *et al.* (1998). "A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(6): 3003-3007.
- Richon, V. M., *et al.* (2009). "Development of vorinostat: Current applications and future perspectives for cancer therapy." Cancer Letters.
- Richon, V. M., *et al.* (2000). "Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10014-10019.
- Riggs, M. G., *et al.* (1977). "n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells." Nature **268**(5619): 462-464.
- Robert, S. A., *et al.* (2004). "Socioeconomic risk factors for breast cancer: distinguishing individual- and community-level effects." Epidemiology **15**(4): 442-450.
- Robertson, D. W., *et al.* (1982). "Antiestrogen basicity--activity relationships: a comparison of the estrogen receptor binding and antiuterotrophic potencies of several analogues of (Z)-1,2-diphenyl-1-[4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl]-1-butene (tamoxifen, Nolvadex) having altered basicity." Journal of Medicinal Chemistry **25**(2): 167-171.
- Robertson, K. D., *et al.* (2000). "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." Nat Genet **25**(3): 338-342.
- Robinson-Rechavi, M., *et al.* (2005). "Explosive lineage-specific expansion of the orphan nuclear receptor HNF4 in nematodes." J Mol Evol **60**(5): 577-586.
- Rocha, W., *et al.* (2005). "Opposite effects of histone deacetylase inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells." Mol Pharmacol **68**(6): 1852-1862.
- Rochira, V., *et al.* (2005). "Estrogens in males: what have we learned in the last 10 years?" Asian Journal of Andrology **7**(1): 3-20.

- Romond, E. H., *et al.* (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." N Engl J Med **353**(16): 1673-1684.
- Rosano, G. M., *et al.* (2001). "Comparative cardiovascular effects of different progestins in menopause." International Journal of Fertility and Women's Medicine **46**(5): 248-256.
- Rosato, R. R., *et al.* (2006). "The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide." Mol Pharmacol **69**(1): 216-225.
- Rountree, M. R., *et al.* (2000). "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci." Nat Genet **25**(3): 269-277.
- Roy, S., *et al.* (2007). "Site-specific acetylation of p53 directs selective transcription complex assembly." J Biol Chem **282**(7): 4765-4771.
- Ruefli, A. A., *et al.* (2001). "The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10833-10838.
- Russo, J., *et al.* (2000). "Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer." J Natl Cancer Inst Monogr(27): 17-37.
- Sakajiri, S., *et al.* (2005). "Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines." Exp Hematol **33**(1): 53-61.
- Sanchez, R., *et al.* (2002). "Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors." Bioessays **24**(3): 244-254.
- Sandor, V., *et al.* (2000). "P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228." Br J Cancer **83**(6): 817-825.
- Santos-Rosa, H., *et al.* (2005). "Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer." Eur J Cancer **41**(16): 2381-2402.
- Sato, M., *et al.* (1996). "Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats." FASEB Journal **10**(8): 905-912.
- Sato, T., *et al.* (1971). "Ultrastructural changes in Friend erythroleukemia cells treated with dimethyl sulfoxide." Cancer Res **31**(10): 1402-1417.
- Saville, B., *et al.* (2000). "Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements." J Biol Chem **275**(8): 5379-5387.
- Scherrer, L. C., *et al.* (1993). "Evidence that the hormone binding domain of steroid receptors confers hormonal control on chimeric proteins by determining their hormone-regulated binding to heat-shock protein 90." Biochemistry **32**(20): 5381-5386.
- Schwabe, J. W., *et al.* (1993). "The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements." Cell **75**(3): 567-578.

- Schwabe, J. W., *et al.* (1995). "The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation." Structure **3**(2): 201-213.
- Seeman, N. C., *et al.* (1976). "Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(3): 804-808.
- Sentis, S., *et al.* (2005). "Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity." Mol Endocrinol **19**(11): 2671-2684.
- Shaaban, A. M., *et al.* (2003). "Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia." Am J Surg Pathol **27**(12): 1502-1512.
- Shaffer, P. L., *et al.* (2004). "Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 4758-4763.
- Shah, M. H., *et al.* (2006). "Cardiotoxicity of histone deacetylase inhibitor depsipeptide in patients with metastatic neuroendocrine tumors." Clin Cancer Res **12**(13): 3997-4003.
- Shang, Y., *et al.* (2002). "Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs." Science **295**(5564): 2465-2468.
- Shang, Y., *et al.* (2000). "Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription." Cell **103**(6): 843-852.
- Sharma, D., *et al.* (2005). "Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells." Mol Endocrinol **19**(7): 1740-1751.
- Sharma, D., *et al.* (2005). "Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells." Molecular Endocrinology **19**(7): 1740-1751.
- Shiau, A. K., *et al.* (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-937.
- Shostak, Y., *et al.* (2005). "Overlapping but separable determinants of DNA binding and nuclear localization map to the C-terminal end of the Caenorhabditis elegans DAF-12 DNA binding domain." J Biol Chem **280**(8): 6554-6560.
- Shupnik, M. A., *et al.* (1991). "Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH beta gene. DNA-estrogen receptor interactions and functional analysis." Journal of Biological Chemistry **266**(26): 17084-17091.
- Silberstein, G. B., *et al.* (1994). "Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens." Endocrinology **134**(1): 84-90.
- Simpson, E., *et al.* (2000). "The role of local estrogen biosynthesis in males and females." Trends in Endocrinology and Metabolism **11**(5): 184-188.
- Simpson, E. R. (2003). "Sources of estrogen and their importance." J Steroid Biochem Mol Biol **86**(3-5): 225-230.
- Singh, M., *et al.* (2006). "Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection." Experimental Biology and Medicine (Maywood) **231**(5): 514-521.

- Skliris, G. P., *et al.* (2003). "Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model." J Pathol **201**(2): 213-220.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada (2007). *Statistiques canadiennes sur le cancer 2007*. Toronto, Canada, Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada.
- Sorlie, T., *et al.* (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(19): 10869-10874.
- Soulez, M., *et al.* (2001). "Identification of novel oestrogen receptor target genes in human ZR75-1 breast cancer cells by expression profiling." Journal of Molecular Endocrinology **27**(3): 259-274.
- Spange, S., *et al.* (2009). "Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels." International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**(1): 14.
- Stadler, W. M., *et al.* (2006). "A phase II study of depsipeptide in refractory metastatic renal cell cancer." Clin Genitourin Cancer **5**(1): 57-60.
- Starling, e. h. (1905). *The Chemical Correlation of the functions of the body*, The Lancet. **2**: 339-341.
- Stein, B., *et al.* (1995). "Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta." Molecular and Cellular Biology **15**(9): 4971-4979.
- Stenoien, D. L., *et al.* (2000). "Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1." Mol Endocrinol **14**(4): 518-534.
- Stenoien, D. L., *et al.* (2001). "Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor alpha-coactivator complexes in living cells." Mol Cell Biol **21**(13): 4404-4412.
- Stenoien, D. L., *et al.* (2001). "FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent." Nat Cell Biol **3**(1): 15-23.
- Sterner, D. E., *et al.* (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 435-459.
- Stimson, L., *et al.* (2009). "Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors." Cancer Letters **280**(2): 177-183.
- Stimson, L., *et al.* (2009). "Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors." Cancer Lett **280**(2): 177-183.
- Strom, A., *et al.* (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(6): 1566-1571.
- Strom, A., *et al.* (2004). "Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1566-1571.
- Suzuki, M., *et al.* (1994). "DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor, and zinc finger families." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12357-12361.

- Taddei, A., *et al.* (2005). "The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy?" EMBO Rep **6**(6): 520-524.
- Tamrazi, A., *et al.* (2003). "Molecular Sensors of Estrogen Receptor Conformations and Dynamics." Mol Endocrinol **17**(12): 2593-2602.
- Tang, X., *et al.* (2007). "Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor." Cell **131**(1): 93-105.
- Tang, Y., *et al.* (2008). "Acetylation is indispensable for p53 activation." Cell **133**(4): 612-626.
- Taunton, J., *et al.* (1996). "A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p." Science **272**(5260): 408-411.
- Termine, J. D., *et al.* (1998). "Post-menopausal women and osteoporosis: available choices for maintenance of skeletal health." Maturitas **30**(3): 241-245.
- Thiagalingam, S., *et al.* (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." Ann N Y Acad Sci **983**: 84-100.
- Thomas, S., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitor induced modulation of anti-estrogen therapy." Cancer Letters.
- Thomas, S., *et al.* (2009). "Histone deacetylase inhibitor induced modulation of anti-estrogen therapy." Cancer Lett.
- Tomkinson, A., *et al.* (1998). "The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis." Journal of Bone and Mineral Research **13**(8): 1243-1250.
- Tomkinson, A., *et al.* (1997). "The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone." Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **82**(9): 3128-3135.
- Travaglini, L., *et al.* (2009). "Epigenetic reprogramming of breast cancer cells by valproic acid occurs regardless of estrogen receptor status." Int J Biochem Cell Biol **41**(1): 225-234.
- Trichopoulos, D., *et al.* (1972). "Menopause and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst **48**(3): 605-613.
- Tsai, M. J., *et al.* (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." Annu Rev Biochem **63**: 451-486.
- Tsuji, N., *et al.* (1976). "A new antifungal antibiotic, trichostatin." J Antibiot (Tokyo) **29**(1): 1-6.
- Turner, R. T. (1999). "Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis." Journal of Bone and Mineral Research **14**(2): 187-191.
- Turner, R. T. (1999). "Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis." J Bone Miner Res **14**(2): 187-191.
- Turner, R. T., *et al.* (1994). "Skeletal effects of estrogen." Endocr Rev **15**(3): 275-300.
- Turner, R. T., *et al.* (1990). "Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats." J Orthop Res **8**(4): 612-617.
- U.S. National Institutes of Health. (2010). "Clinical Trials." Retrieved august, 2010, from <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>.

- Uht, R. M., *et al.* (2004). "A conserved lysine in the estrogen receptor DNA binding domain regulates ligand activation profiles at AP-1 sites, possibly by controlling interactions with a modulating repressor." Nucl Recept **2**(1): 2.
- Umayahara, Y., *et al.* (1994). "Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer." Journal of Biological Chemistry **269**(23): 16433-16442.
- Urnov, F. D., *et al.* (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases." Nature **435**(7042): 646-651.
- van 't Veer, L. J., *et al.* (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." Nature **415**(6871): 530-536.
- van Leeuwen, F. E., *et al.* (1994). "Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer." Lancet **343**(8895): 448-452.
- Vansteenkiste, J., *et al.* (2008). "Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer." Investigational New Drugs **26**(5): 483-488.
- Visvader, J. E. (2009). "Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis." Genes & Development **23**(22): 2563-2577.
- Vrana, J. A., *et al.* (1999). "Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53." Oncogene **18**(50): 7016-7025.
- Wade, G. N., *et al.* (1993). "ICI 182,780: a pure antiestrogen that affects behaviors and energy balance in rats without acting in the brain." American Journal of Physiology **265**(6 Pt 2): R1392-1398.
- Wakeling, A. E. (1995). "Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens." Biochemical Pharmacology **49**(11): 1545-1549.
- Wakeling, A. E. (1995). "Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens." Biochem Pharmacol **49**(11): 1545-1549.
- Wakeling, A. E., *et al.* (1987). "Steroidal pure antioestrogens." Journal of Endocrinology **112**(3): R7-10.
- Wakeling, A. E., *et al.* (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Res **51**(15): 3867-3873.
- Wakeling, A. E., *et al.* (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Research **51**(15): 3867-3873.
- Walter, P., *et al.* (1985). "Cloning of the human estrogen receptor cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(23): 7889-7893.
- Walton, T. J., *et al.* (2008). "DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines." Prostate **68**(2): 210-222.
- Wang, C., *et al.* (2001). "Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity." Journal of Biological Chemistry **276**(21): 18375-18383.
- Warren, C. L., *et al.* (2006). "Defining the sequence-recognition profile of DNA-binding molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(4): 867-872.



- Watanabe, T., *et al.* (2007). "DNA and estrogen receptor interaction revealed by fragment molecular orbital calculations." Journal of Physical Chemistry B **111**(32): 9621-9627.
- Watanabe, T., *et al.* (2007). "DNA and estrogen receptor interaction revealed by fragment molecular orbital calculations." J Phys Chem B **111**(32): 9621-9627.
- Watson, C. S., *et al.* (2005). "Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens." Steroids **70**(5-7): 364-371.
- Watson, C. S., *et al.* (1999). "Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **220**(1): 9-19.
- Watson, P. H., *et al.* (1991). "Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer." Cancer Research **51**(15): 3996-4000.
- Watts, C. K., *et al.* (1995). "Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation." Mol Endocrinol **9**(12): 1804-1813.
- Watts, C. K., *et al.* (1995). "Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation." Molecular Endocrinology **9**(12): 1804-1813.
- Webb, P., *et al.* (1999). "The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions." Molecular Endocrinology **13**(10): 1672-1685.
- Webb, P., *et al.* (2003). "ERbeta Binds N-CoR in the Presence of Estrogens via an LXXLL-like Motif in the N-CoR C-terminus." Nucl Recept **1**(1): 4.
- Wehling, M. (1997). "Specific, nongenomic actions of steroid hormones." Annual Review of Physiology **59**: 365-393.
- Wehling, M., *et al.* (2006). "Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology." Maturitas **54**(4): 321-326.
- Weinberger, C., *et al.* (1985). "Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection." Science **228**(4700): 740-742.
- Wijayaratne, A. L., *et al.* (2001). "The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators." J Biol Chem **276**(38): 35684-35692.
- Willett, W. C., *et al.* (1987). "Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer." New England Journal of Medicine **316**(19): 1174-1180.
- Williams, I. J., *et al.* (1953). "Carcinoma of female breast: conservative and radical surgery." BMJ(2): 9.
- Wilson, A. J., *et al.* (2006). "Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer." Journal of Biological Chemistry **281**(19): 13548-13558.

- Wilson, M. E., *et al.* (2009). "Regulation of oestrogen receptor gene expression: new insights and novel mechanisms." J Neuroendocrinol **21**(4): 238-242.
- Wise, P. M. (2003). "Estrogens: protective or risk factors in brain function?" Progress in Neurobiology **69**(3): 181-191.
- Wolfe, S. A., *et al.* (1999). "Analysis of zinc fingers optimized via phage display: evaluating the utility of a recognition code." J Mol Biol **285**(5): 1917-1934.
- Wolfe, S. A., *et al.* (2000). "DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **29**: 183-212.
- Woolley, C. S., *et al.* (1992). "Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat." Journal of Neuroscience **12**(7): 2549-2554.
- Wurtz, J. M., *et al.* (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." Nature Structural Biology **3**(1): 87-94.
- Xu, H. E., *et al.* (2002). "Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha." Nature **415**(6873): 813-817.
- Xu, W. S., *et al.* (2007). "Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action." Oncogene **26**(37): 5541-5552.
- Yang, X., *et al.* (2001). "Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells." Cancer Research **61**(19): 7025-7029.
- Yang, X., *et al.* (2001). "Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells." Cancer Res **61**(19): 7025-7029.
- Yang, X. J., *et al.* (2007). "HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention." Oncogene **26**(37): 5310-5318.
- Yang, X. J., *et al.* (2008). "Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications." Molecular Cell **31**(4): 449-461.
- Yi, X., *et al.* (2008). "Histone deacetylase inhibitor SAHA induces ERalpha degradation in breast cancer MCF-7 cells by CHIP-mediated ubiquitin pathway and inhibits survival signaling." Biochem Pharmacol **75**(9): 1697-1705.
- Yi, X., *et al.* (2008). "Histone deacetylase inhibitor SAHA induces ERalpha degradation in breast cancer MCF-7 cells by CHIP-mediated ubiquitin pathway and inhibits survival signaling." Biochemical Pharmacology **75**(9): 1697-1705.
- Ylikomi, T., *et al.* (1998). "Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity." Crit Rev Biochem Mol Biol **33**(6): 437-466.
- Yoshida, M., *et al.* (1990). "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A." Journal of Biological Chemistry **265**(28): 17174-17179.
- Yoshinaga, S. K., *et al.* (1992). "Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors." Science **258**(5088): 1598-1604.

- Yuan, Z. L., *et al.* (2005). "Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue." Science **307**(5707): 269-273.
- Zhang, Y., *et al.* (2006). "Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis." Cell Death and Differentiation **13**(1): 129-140.
- Zhang, Y., *et al.* (2003). "HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo." EMBO J **22**(5): 1168-1179.
- Zhang, Z., *et al.* (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*." Breast Cancer Res Treat **94**(1): 11-16.
- Zhao, Y., *et al.* (2005). "Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(44): 16090-16095.
- Zheng, W., *et al.* (1998). "Well-done meat intake and the risk of breast cancer." Journal of the National Cancer Institute (1988) **90**(22): 1724-1729.
- Zhou, X., *et al.* (2000). "Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1056-1061.
- Zhu, P., *et al.* (2004). "Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis." Cancer Cell **5**(5): 455-463.
- Ziegler, R. G., *et al.* (1993). "Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women." J Natl Cancer Inst **85**(22): 1819-1827.
- Zilliagus, J., *et al.* (1995). "Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors." Molecular Endocrinology **9**(4): 389-400.

