

Université de Montréal

Régulation de l'expression de HYAL-1 par le récepteur de l'œstrogène alpha

Par

Lydia Edjekouane

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
En Sciences Biomédicales
Option Générale

Décembre 2011

© Lydia Edjekouane, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Régulation de l'expression de HYAL-1 par le récepteur
de l'œstrogène alpha**

Présentée par:
Lydia Edjekouane

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Stéphane Lefrançois, président-rapporteur
Dr. Euridice Carmona, directeur de recherche
Dr. Manuela Santos, membre du jury

Résumé

HYAL-1 (hyaluronidase-1) appartient à la famille des hyaluronidases connues pour leur rôle dans la dégradation de l'acide hyaluronique. L'expression de HYAL-1 est élevée dans de nombreux type de cancers, notamment dans le cancer de la prostate, de la vessie, des reins et du sein où il est impliqué dans la croissance tumorale et les métastases. Récemment notre laboratoire a aussi démontré une expression élevée de HYAL-1 dans le cancer épithélial de l'ovaire (CEO) de type mucineux et à cellules claires, expression qui est inversement corrélée à celle du récepteur de l'œstrogène alpha (RE α). Cependant, malgré le fait que le rôle de HYAL-1 dans le cancer soit bien établi, le mécanisme de sa régulation reste encore inconnu. Le RE α est un facteur de transcription qui suite à sa liaison avec son ligand va réguler l'expression de plusieurs gènes. Le RE α ainsi stimulé par l'hormone va activer la transcription de ces gènes cibles mais il est connu maintenant qu'une grande partie des gènes régulés par le RE α sont en réalité réprimés par ce récepteur. Dans ce travail nous proposons d'étudier le mécanisme de la régulation du gène HYAL-1 par le RE α dans le CEO à cellules claires et dans le cancer du sein. L'expression ectopique du RE α dans la lignée TOV21G (RE-) de même que le traitement de la lignée MCF-7 (RE+) avec de l'œstrogène a induit une diminution du niveau d'expression de l'ARN m de HYAL-1. Ces résultats nous ont permis de confirmer que HYAL-1 est un gène cible du RE α . Il est aussi connu que le RE α peut exercer son action par différents mécanismes d'action, entre autres en interagissant avec une séquence d'ADN appelée élément de réponse à l'œstrogène (ERE), retrouvé sur le promoteur des gènes cibles ou bien indirectement par des interactions protéine-protéine en se liant à d'autres facteur de transcription tels que Sp1. Après avoir identifiés de telles séquences sur le promoteur proximal de HYAL-1, (1 ERE proximal à -900 pb, 3 distaux à -32350 pb, 48430, -50130 pb du site d'initiation de la transcription) en plus des 2 Sp1 connus (-60 et - 1020pb), nous avons démontrés par immunoprécipitation de la chromatine que le RE α est recruté sur le promoteur de HYAL-1 au niveau de l'ERE proximal -900 pb et du distal -32350 pb de même que sur le site Sp1 -1020 pb. De plus, l'activité biologique de l'ERE -900 pb et du

Sp1-1020pb à été confirmée par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase. Avec son rôle connu dans la tumorigenèse, l'identification de HYAL-1 comme gène cible du RE α pourrait être une avenue intéressante pour le traitement des cancers hormono-indépendants.

Mots-clés : Hyaluronidase-1, récepteur de l'œstrogène alpha, cancer épithélial de l'ovaire à cellules claires, régulation transcriptionnelle, répression de gènes.

Abstract

HYAL-1 (hyaluronidase-1) belongs to the hyaluronidase family of enzymes that degrade hyaluronic acid. HYAL-1 expression is elevated in many types of cancers including prostate, bladder, liver and breast cancer where it is involved in tumor growth and metastasis. In accordance to these observations, our group has also demonstrated high expression of HYAL-1 in clear cell and mucinous epithelial ovarian cancer (EOC) subtypes which was inversely correlated to that of estrogen receptor alpha (ER α). However, despite the fact that the role of HYAL-1 in cancer is well established, the mechanism of its regulation is still unknown. ER α is a transcriptional factor that regulates target-gene expression following ligand binding. Upon hormone stimulation, activated ER α will upregulate transcription of many target genes. However, it has been recently well documented that a large number of ER α responsive genes are in fact repressed. In this work we propose to study the mechanism by which ER α regulates HYAL-1 expression in clear cell EOC subtype as well as in breast cancer. The ectopic expression of ER α in TOV21G cell line (ER α -) and estrogen treatment of MCF-7 cells (ER α +) decreased HYAL-1 mRNA expression and allowed us to confirm that HYAL-1 is an ER α target gene. It is also known that ER α may exert its action through different mechanisms of action including interacting with a DNA sequence called estrogen response element (ERE) found in the promoter of target genes or indirectly by protein-protein interactions by binding to other transcription factor such as Sp1. Having identified such sequences in the proximal promoter of HYAL-1, (one proximal ERE -900 bp, 3 distals at -32350, -48430, -50130 bp from the start site of transcription) in addition to the two known Sp1 (-60 and -1020bp), we have demonstrated by chromatin immunoprecipitation that ER α is recruited at the HYAL-1 promoter at the ERE sites -900 pb and -32350 pb as well as at the Sp1 site -1020. Furthermore, the biological activity of the proximal ERE -900 and Sp1 -1020 sites were further confirmed by luciferase reporter gene assay. Given its known role in tumorigenesis, identification of HYAL-1 as an ER α target may provide an interesting approach for the treatment of hormono-independent cancer.

Keywords: Hyaluronidase-1, estrogen receptor alpha, clear cell epithelial ovarian cancer, transcriptional regulation, genes repression.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Remerciements	xiv
1 Introduction	1
1.1 Le récepteur de l'œstrogène (RE) : Structure, fonction et rôle biologique	1
1.1.1 Découverte du RE	1
1.1.2 Gènes codant le RE α et le RE β	2
1.1.3 Structure du RE	3
1.1.4 Les ligands du RE	6
1.1.5 Rôle biologique du RE	9
1.1.6 Mécanisme d'action du RE	12
1.1.7 Œstrogène, récepteur de l'œstrogène et cancer	20
1.2 Le cancer épithélial de l'ovaire	24
1.2.1 Caractéristiques des 4 types histopathologiques du CEO	26
1.3 Les hyaluronidases	29
1.3.1 Classification	29
1.3.2 Organisation génomique	30
1.3.3 Caractéristiques et rôles physiologiques des hyaluronidases mammifères	33
1.3.4 L'acide hyaluronique	36
1.3.5 Les hyaluronidases et le cancer	38
1.4 Hypothèse et objectifs	39
2 Matériels et méthodes	40
2.1 Lignées cellulaires	40

2.2	Culture cellulaire et transfection transitoire	40
2.3	Western blot	41
2.4	Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel.....	41
2.5	Genome wide scan des sites de liaison du RE α	43
2.6	Génération de clones stables	43
2.7	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	44
2.8	Les vecteurs d'expression	46
2.9	Clonage Moléculaire	47
2.9.1	Amplification des inserts par PCR.....	47
2.9.2	Clonage dans le vecteur pBluescript.....	48
2.9.3	Sous-clonage dans le vecteur pBLUC.....	49
2.10	Essai luciférase.....	51
2.11	Analyse statistique	51
3	Résultats	52
3.1	HYAL-1 est sous-exprimé par le RE α dans la lignée TOV21G.....	52
3.2	Identification d'EREs sur le promoteur de HYAL-1 par Genome Wide Scan....	54
3.3	Génération de clones stables TOV21G-ER α	55
3.4	HYAL-1 est sous-exprimé par le RE α dans la lignée MCF-7	57
3.5	Implications des sites EREs et Sp1 de la région promotrice de HYAL-1 dans le recrutement du RE α	58
3.6	Implication biologique des sites EREs et Sp1 proximaux de la région promotrice de HYAL-1 dans la régulation transcriptionnelle du gène HYAL-1 par le RE α	61
4	Discussion	65
5	Perspectives et conclusion.....	70
6	Bibliographie.....	i

Liste des figures

Figure 1 Représentation des différents isoformes du RE α et RE β	3
Figure 2 Domaines fonctionnels des récepteurs des œstrogènes.	5
Figure 3 Structure du LBD du RE α déterminée aux rayons X.	6
Figure 4 Structures chimiques du 17- β œstradiol et de trois anti-œstrogènes.	9
Figure 5 Différents types d'éléments de réponse à l'œstrogène reconnus par le RE.....	14
Figure 6 Représentation des différents coactivateurs et corépresseurs impliqués dans l'activité transcriptionnelle du RE.	17
Figure 7 Résumé des différents mécanismes d'action du RE.....	20
Figure 8 Représentation des 4 types histopathologiques majeurs du CEO.....	26
Figure 9 Arrangement chromosomique des différents gènes hyaluronidases chez l'humain et la souris.	31
Figure 10 Les gènes codants les hyaluronidases humaines.	32
Figure 11 Les différents domaines protéiques des hyaluronidases.	33
Figure 12 Représentation de la structure du HA.....	36
Figure 13 Séquence de la région promotrice proximale de HYAL1.	50
Figure 14 Régulation négative de HYAL-1 par le RE α dans la lignée TOV21G.....	53
Figure 15 Promoteur de HYAL-1	55
Figure 16 Expression stable du RE α dans la lignée TOV21G.....	56
Figure 17 Régulation négative de HYAL-1 par le RE α dans la lignée MCF-7.....	58
Figure 18 Recrutement du RE α aux sites Sp1 et EREs localisés sur la région proximale et distale du promoteur de HYAL-1.	60
Figure 19 Construction de pBLUC-F1 et pBLUC-F2	61
Figure 20 Répression du promoteur de HYAL-1 par le RE α via l'ERE et/ou Sp1	64

Liste des tableaux

Tableau 1 Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par q-RT-PCR.	42
Tableau 2 Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par q-PCR.....	46
Tableau 3 Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.	48

Liste des abréviations

°C	degrés Celsius
%	pourcentage
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AD1	activation domaine 1
AD2	activation domaine 2
AF-1	activation fonction 1
AF2	activation fonction 2
AP1	activating protein 1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adenosine triphosphate
bHLH	basic helix loop helix
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog
CARM	co-activator Associated arginine Methyl Transferase
CBP	CREB-binding protein
CEO	cancer epithelial de l'ovaire
ChIP	chromatine immuniprecipitation
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	cycle threshold
CTNNB1	gène encodant les β -catenins.
DBD	DNA Binding Domaine
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
EGF	epidermal growth factor
Egr-1	early growth response-1
E1	estradiol
E2	estrone

E3	estriol
ERE	Élément de réponse à l'œstrogène
ERCC1	Gène encodant la protéine impliquée dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides
ERR	estrogen related receptor
FBS	fetal bovin serum
FGF	fibroblast growth factor
FIGO	fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
GOG	groupe d'oncologie gynécologique
GPI	glycosylphosphatidil-inositol
GR	récepteur des glucocorticoïde
GREB	regulation by estrogen in breast cancer
HA	acide hyaluronique
HDAC	Histone desacétylase
HNF-1 β	hepatocyte nuclear factor-1 beta
Hsp90	Heat shock protein 90
HYAL-1	hyaluronidase 1
HYAL-2	hyaluronidase 2
HYAL-3	hyaluronidase 3
ICI	imperial chemical industrie
IGF-1R	insulin-like Growth Factor 1
IgG	immunoglobuline de type g
Kb	kilo bases
KDa	kilo Dalton
KO	knock out
KRAS	kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog
LBD	ligand binding domaine
LGALS4	galectin 40
LRP16	gène encodant la protéine LRP16 pour leukemia related protein 16
LXR	liver X receptor

MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCF-7	michigan cancer foundation - 7
MR	récepteur des mineralocorticoides
MUC	mucin
NaCl	chlorure de sodium
NCoR	nuclear Hormone Corepressor
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NPIP1	nuclear receptor interacting factor 1
OHT	hydroxyl-tamoxifène
OMS	rganisation mondial de la santé
OSE	Paire de base
Pb	ovarian Surface Epithélium
RHAMM	receptor for hyaluronan-mediated motility
PIC	protease inhibitor cocktail
PI3k	phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA	gène codant PI3k
PIP-3	phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs des peroxisomes
PR	Récepteur de la progesterone
PRMT	protein Argenin Methyl Transferase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAR	récepteur de l'Acide retinoic
RE	récepteur de l'œstrogène
REA	repressor of Estrogen Receptor Activity
RIP40	receptor Interacting Protein 140
RVD	récepteur de la vitamine D
RXR	récepteur X des retinoides
Sp1	specificity protein 1
SMRT	silencing mediator of retinoic and thyroid hormone Receptors

SPAM1	sperm adhesion molecule 1
SEO	Surface epithelium ovarian
SRC	Steroid Receptor Coactivator
TBS	tris buffer salin
TFF1	tréfoil factor 1
TP53	tumot protein 53
TGF β	transforming growth factor beta
tk	tymidine kinases
SDS	dodécylsulfate de sodium
siRNA	small interfering RNA
Swi/Snf	witching mating type/sucrose non fermenting
ZPB	zona pellucid binding

À mes parents à qui je dois tout

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier sincèrement le Dre. Euridice Carmona pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et donner l'opportunité d'y faire ma maîtrise. Je la remercie pour son encadrement, ses compétences mais surtout pour la patience dont elle a su faire preuve à mon égard et sa disponibilité durant tout ce temps. Pour sa passion et son enthousiasme pour la recherche qu'elle sut me transmettre. Ce fût un honneur pour moi de travailler à ses coté, c'est pourquoi je lui exprime toute ma gratitude.

Je remercie également le Dr André Tremblay pour sa collaboration sur le projet, pour toutes ses idées et sa générosité, ce travail n'aurait pu se faire sans son aide précieuse.

Un grand merci à Adriana pour m'avoir aidée, conseillée à chaque fois que j'en avais besoin, et aussi pour sa gentillesse, sa compagnie irremplaçable et sa bonne humeur qui a rendu le travail au labo aussi agréable. J'ai eu beaucoup de plaisir à t'avoir comme collègue.

Merci à Hélène, qui m'a initié au travail de laboratoire et qui a pris le temps de tout m'expliquer.

Merci au Dre. Stéphanie Botardi qui m'a beaucoup aidé avec les expériences de ChIP et a répondu à mes nombreuses questions.

Finalement, je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenue et encouragée tout au long de mes études. Si je me suis rendu aussi loin c'est incontestablement grâce à vous. À travers ce travail j'espère vous rendre un peu l'amour que vous m'avez apporté durant toutes ces années.

1 Introduction

1.1 Le récepteur de l'œstrogène (RE) : Structure, fonction et rôle biologique

Le RE est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires activés par un ligand. Il existe 48 récepteurs nucléaires, la comparaison de leurs séquences ainsi que les analyses phylogénétiques ont permis de les regrouper dans six classes dont les membres comprennent entre autres le récepteur de la progestérone (PR), de l'acide rétinoïque (RAR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et de la vitamine D. D'autres récepteurs n'ont pas de ligand endogène et sont classés dans la catégorie des récepteurs orphelins.

1.1.1 Découverte du RE

L'existence du RE fut mise en évidence la première fois par Jensen et Jacobson en 1960 (1), en utilisant de l'œstradiol (E2) marqué au tritium, ils ont remarqué qu'il n'était retenu que dans les tissus cibles de cette hormone et émis l'hypothèse de l'existence d'un récepteur pour cette molécule. Isolé et caractérisé par Toft et Gorski en 1966 (2), le gène codant le RE α a été cloné pour la première fois en 1985 à partir de la lignée cellulaire humaine du cancer du sein : la MCF-7 (3) puis séquencé en 1986 (4). Ce n'est que 10 années plus tard qu'un second RE fut découvert d'abord chez le rat (5) puis chez l'homme (6) et enfin chez la souris (7) et nommé RE β , le premier fut alors renommé RE α par opposition au second.

1.1.2 Gènes codant le RE α et le RE β

Le RE α et RE β sont codés par deux gènes séparés appelés ESR1 et ESR2, localisés sur deux chromosomes distincts 6q25.1 et 14q23-24.1, respectivement. Les deux gènes sont constitués de 8 exons séparés par 7 introns. L'exon 1 code pour la région A/B, les exons 2 et 3 pour une partie de la région C, toute la région D et une partie de la région E, les exons 3-4 pour le reste de la région E et le dernier exon pour la région F, le produit étant une protéine de 595 acides aminés (aa) d'environ 66 kDa pour le RE α et une protéine de 530 aa de 60 kDa pour le RE β (Figure 1) (8). Le gène ESR1 possède 7 promoteurs, l'usage de ces différents promoteurs ainsi que l'épissage alternatif conduit à l'existence de plusieurs transcrits qui diffèrent du récepteur sauvage aussi bien en structure au niveau de la région 5' non traduite mais aussi en fonction (9). Deux isoformes du RE α ont été isolés (Figure 1), un à 46 kDa, il ne possède pas les premiers 173 aa du RE α sauvage et il est connu pour antagoniser ces effets prolifératifs dans la lignée cancéreuse MCF-7. Un autre à 36 kDa et qui diffère beaucoup du récepteur sauvage, on le retrouve associé à la membrane plasmique et agit comme dominant négatif du RE α sauvage (10). Un autre isoforme dont l'exon 3 a été deleté (ER α - Δ 3) résultant en une partie du DBD manquante (Figure 1), il agit également comme un dominant négatif du récepteur sauvage en formant un heterodimère avec lui étant donné qu'il ne peut pas lier l'ADN. D'autres variants formés à partir de l'épissage de l'ARNm ont été décrits mais à savoir s'ils sont exprimés en tant que protéines fonctionnelles n'est pas encore claire (11). Le RE β quant à lui possède de multiples isoformes issus de l'épissage alternatif du dernier exon codant le récepteur sauvage (Figure 1), la plupart sont exprimés sous forme de protéines dans divers tissus et lignées cellulaires, ils ne sont pas fonctionnels dans leur forme d'homodimère mais peuvent s'hétérodimériser avec le RE β sauvage et augmenter son activité transcriptionnelle (12).

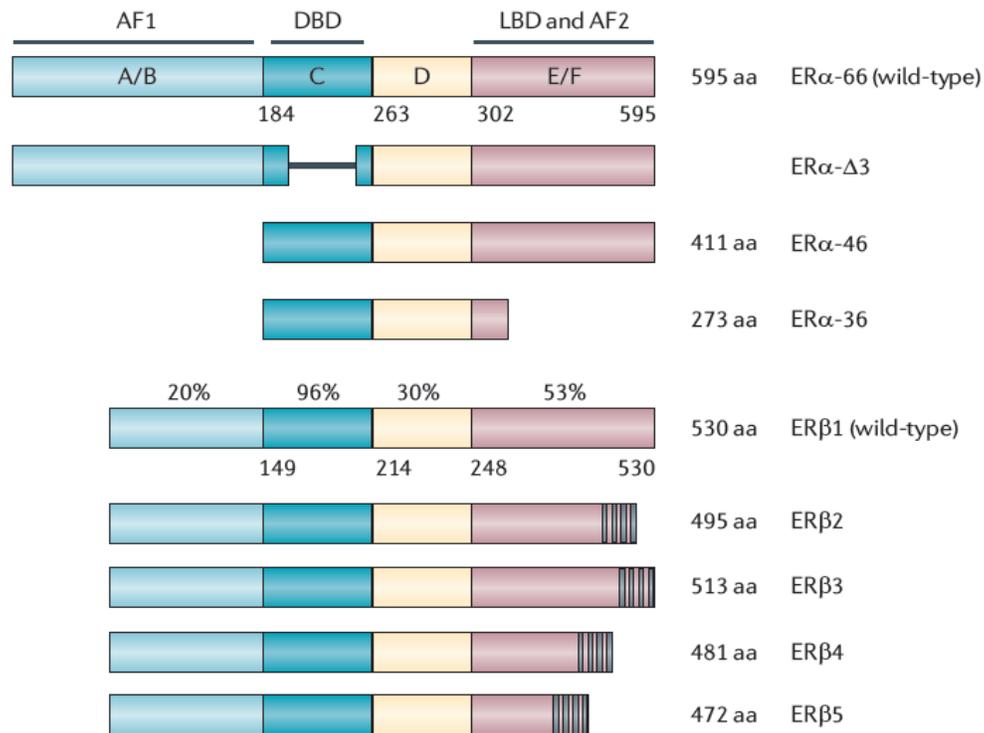


Figure 1 Représentation des différents isoformes du RE α et RE β . Extraite de la référence (13).

1.1.3 Structure du RE

Les analyses biochimiques et les études de mutagenèse ont mis en évidence que le RE α et RE β tout comme les autres membres de la famille des récepteurs nucléaires possèdent une structure modulaire formée de 6 régions distinctes (A-F) (14). Les structures du RE α et RE β de même que le pourcentage d'homologie en aa sont représentées dans la figure 2.

1.1.3.1 Le domaine N-terminal

Constitué par les régions A/B (Figure 2), il présente une structure désorganisée, c'est pour cette raison d'ailleurs que la structure cristalline du RE en entier n'a pu être réalisé mais faite individuellement pour chaque domaine. C'est cette région A/B qui est responsable de la fonction d'activation de la transcription indépendante du ligand appelée AF-1 pour activation function 1, elle est aussi impliquée dans les interactions protéine-protéine, ce domaine est très variable en taille et en séquence et très peu conservé entre le RE α et RE β avec seulement 17% d'homologie, l'activité AF1 du RE β est négligeable comparée à celle du RE α (15, 16).

1.1.3.2 Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Il correspond à la région C (Figure 2), comme son nom l'indique il permet la liaison du récepteur nucléaire à l'ADN au niveau d'une séquence palindromique appelée ERE (élément de réponse à l'œstrogène) retrouvée sur le promoteur des gènes cibles, en plus de jouer un rôle dans la dimérisation, ce rôle bivalent est rendu possible grâce à sa structure contenant deux motifs à doigt de zinc. C'est le domaine le plus conservé entre tous les récepteurs nucléaires avec 97% d'homologie entre le RE α et RE β , ce qui suggère que les deux récepteurs peuvent se fixer sur la même séquence (14, 17).

1.1.3.3 Le domaine D

C'est une région charnière peu structurée et très variable, peu est connu sur sa fonction, elle contient des sites pour des modifications post-traductionnelles principalement l'acétylation et la sumoylation en plus de signaux de localisation nucléaire hormono-indépendants (8).

1.1.3.4 Le domaine de liaison du ligand (LBD)

Il correspond aux régions E/F (Figure 2), c'est le domaine le plus important car de par son rôle évident dans la liaison du ligand, il joue également un rôle dans la dimérisation et contient la fonction d'activation de la transcription (AF-2) dépendante du ligand, il est

aussi impliqué dans la localisation nucléaire et l'association avec la protéine de choc thermique Hsp90 (Heat shock protein). En reconnaissant l'hormone, il assure la spécificité et la sélectivité de la réponse physiologique. La structure du domaine AF2 est très ordonnée contrairement à celle du domaine N-terminal, il contient les hélices 3, 4, 5 et 12. Si les trois premières restent inchangées, la structure cristallographique aux rayons X de ce domaine a révélé que l'hélice 12 va adopter différentes conformations selon que le ligand soit un agoniste ou un antagoniste, ainsi en présence de l'agoniste, l'hélice 12 va se positionner sur la cavité de liaison du ligand et la refermer comme un couvercle, générer une fonction AF-2 compétente tout en formant un sillon hydrophobe favorable aux recrutement de coactivateurs transcriptionnels, alors que l'antagoniste ne permet pas le positionnement de l'hélice 12 au-dessus de la cavité empêchant l'activation du domaine AF-2 (Figure 3) (18-20).

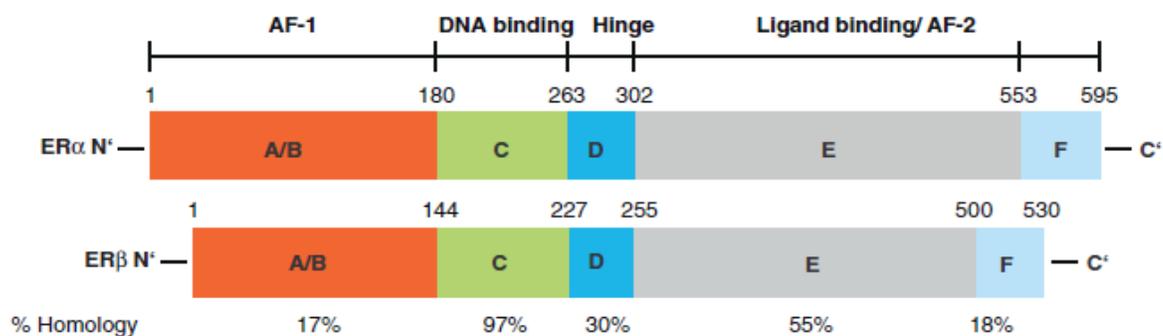


Figure 2 Domaines fonctionnels des récepteurs des œstrogènes.

La région N-terminal-A/B contient le domaine AF-1, la région C contient le DBD, la région D est une région charnière et la région E/F correspond au domaine LBD et contient aussi le domaine AF-2. Le pourcentage d'homologie entre le RE α et le RE β est aussi représenté de même que le nombre d'aa. Extraite à partir de la référence (21).

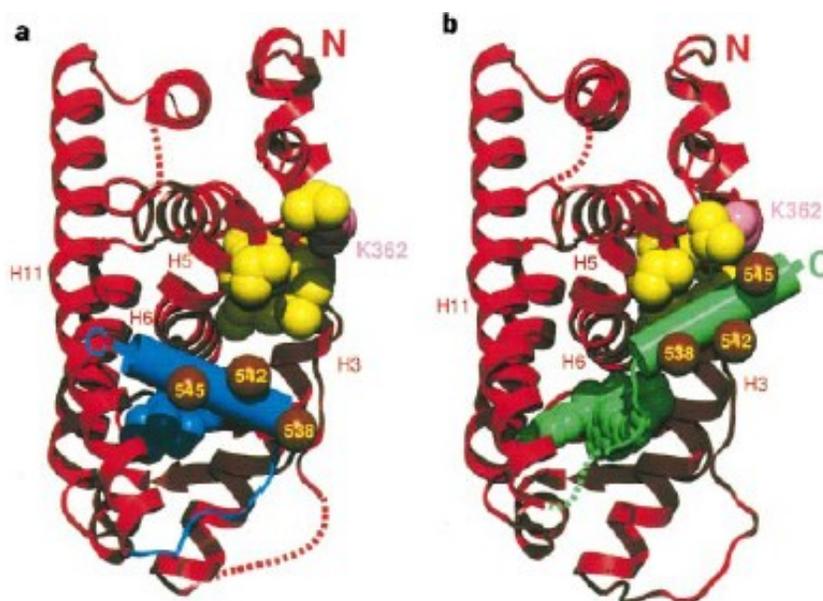


Figure 3 Structure du LBD du RE α déterminée aux rayons X.

L'hélice 12 dont la position varie en fonction du ligand est représentée par un cylindre bleu dans le cas de la liaison avec l'œstradiol (a) et en vert en cas de liaison avec l'anti-œstrogène raloxifène (b). Extraite à partir de la référence (20).

1.1.4 Les ligands du RE

1.1.4.1 Les œstrogènes

Ce sont les ligands naturels du RE, on retrouve l'œstrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2) et l'oestriole (E3), l'E2 étant l'œstrogène le plus abondant et ayant une forte affinité avec le RE (Figure 4). Cette hormone est synthétisée principalement par l'ovaire au niveau des cellules de la granulosa et est très connue pour son rôle physiologique dans la croissance et la différenciation du système reproducteur femelle (glande mammaire, ovaire et utérus) mais joue également un rôle chez l'homme où on la retrouve au niveau des testicules, sans oublier ces effets protecteurs contre la déminéralisation des os et aussi au niveau cardiovasculaire et nerveux chez les deux sexes. Les œstrogènes dérivent du

cholestérol et sont donc hydrophobes, ceci leur permet de passer à travers la bicouche lipidique et la membrane nucléaire pour se lier au RE. Dans la nature, on retrouve les phyto-œstrogènes chez les végétaux (22).

1.1.4.2 Les anti-œstrogènes

Après que le rôle des œstrogènes dans la genèse et la prolifération tumorale dans le cancer du sein notamment fut bien établi (Voir section 1.1.7.1), l'idée d'utiliser des anti-œstrogènes s'est imposée d'elle-même. En effet, ces molécules vont bloquer l'interaction de l'œstrogène avec son récepteur, ceci peut se faire soit en bloquant carrément la production de l'œstrogène par ovariectomie ou par l'inhibition de la conversion du précurseur de l'œstrogène par des inhibiteurs d'aromatase ou bien c'est le RE qui est ciblé par des agonistes partiels ou des antagonistes purs.

1.1.4.2.1 Les agonistes partiels

Plus connus sous le nom de SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators) car pouvant se comporter à la fois en antagonistes du RE au niveau des tumeurs mammaires tout en mimant le rôle des œstrogènes sur d'autres tissus où le RE a des rôles bénéfiques. Le premier à avoir été développé est le tamoxifène (ICI 46474; Nolvadex), c'est l'agent chimiothérapeutique le plus couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein. Il présente une structure triphenyl-éthylène non stéroïde (Figure 4). Administré sous forme de citrate de tamoxifène, il est convertit dans le foie principalement en 4-hydroxy-Tamoxifène (OHT) qui a une forte affinité pour le RE α . Étant un agoniste partiel de l'œstrogène, il présente des effets bénéfiques dans le maintien de la densité osseuse mais augmente le risque des accidents cardio-vasculaires, en plus de stimuler la croissance tumorale au niveau de l'endomètre. Ceci à mener au développement d'un autre anti-œstrogène, le raloxifène (Figure 4) qui est un benzothiophène non stéroïde avec une structure tridimensionnelle similaire à celle du tamoxifène, il possède les mêmes effets protecteurs

que le tamoxifène au niveau des os mais contrairement à ce dernier, il agit également comme antagoniste au niveau de l'utérus (23, 24). L'OHT et le raloxifène compétitionnent avec l'E2 pour le site AF2 du LBD (Figure 2) au niveau du RE, et bloquent de ce fait la liaison de l'E2. Le RE est toujours capable de se dimériser, cependant la présence de l'OHT va affecter le positionnement de l'hélice 12 (Figure 3), empêcher l'activation du domaine AF-2 et favoriser le recrutement de corépresseurs à la place de coactivateurs (qui seront détaillés dans la section (1.1.6.1.3) (20, 25-27). La propriété agoniste des SERMs est médiée par le domaine d'activation de la transcription AF-1 du RE (28).

1.1.4.2.2 Les antagonistes purs

L'ICI 182,780 (Imperial Chemical Industrie) également connu sous le nom de fulvestrant (Figure 4), dépourvu d'activité agoniste, il ne fait pas que se lier au RE pour inhiber sa liaison avec l'E2 comme c'est le cas des autres anti-œstrogènes partiels, mais il entraîne aussi la dégradation de RE. En effet, suite à son entrée au noyau l'ICI altère la dimérisation du RE, le complexe RE-ICI est alors instable et inactif car les domaines AF-1 et AF-2 sont désactivés, tout ceci conduit à la dégradation du RE au niveau protéique sans pour autant affecter l'ARNm. Étant dépourvu d'activité agoniste, son utilisation pourrait être combinée avec des médicaments contre l'ostéoporose (29-32).

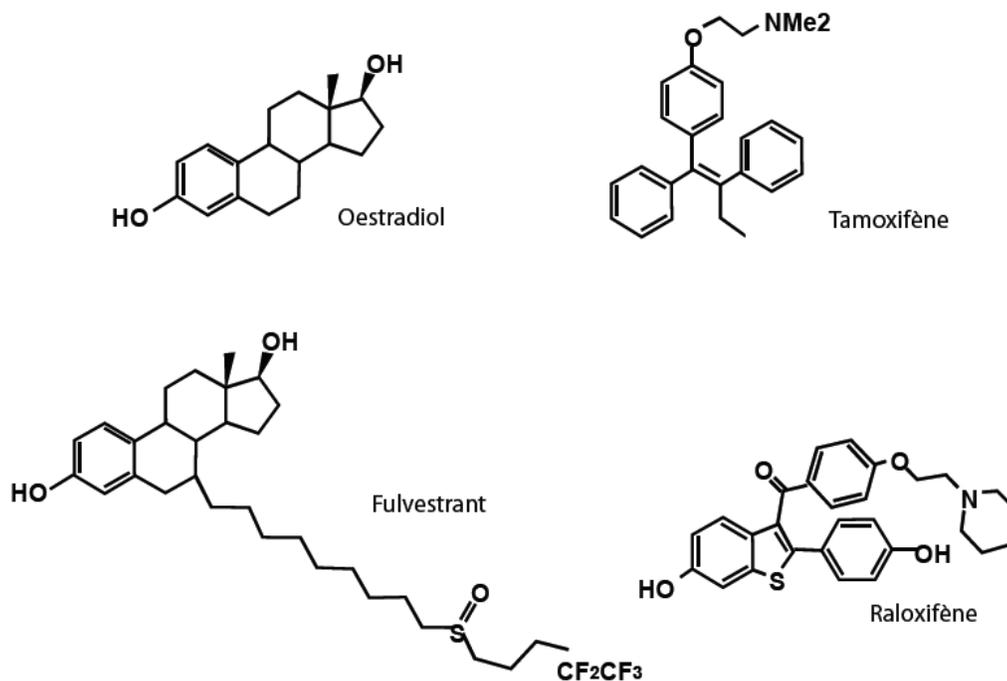


Figure 4 Structures chimiques du 17- β œstradiol et de trois anti-œstrogènes. Extraite de la référence (33).

1.1.5 Rôle biologique du RE

1.1.5.1 Distribution tissulaire

Le RE α et RE β sont largement distribués dans l'organisme, ainsi des études d'immunohistochimie, de Northern blot, d'hybridation in-situ et de q-RT-PCR ont permis de les identifier au niveau des tissus reproducteurs femelles (ovaire, utérus, sein) mais pas seulement, car on les retrouve également dans le colon, l'os, le cerveau, le système cardiovasculaire, le foie et la prostate, sachant que dans un même tissu les deux peuvent avoir différentes localisations à l'exemple de l'ovaire où le RE α se retrouve au niveau des

cellules de la thèque et des cellules interstitielles alors que le RE β est retrouvé dans les cellules de la granulosa, même chose dans la prostate où le RE β se situe dans l'épithélium et le stroma alors que le RE α n'est présent que dans le stroma (34-36).

1.1.5.2 Rôle dans l'appareil reproducteur

Afin d'évaluer le rôle du RE dans l'organisme, des souris déficientes (Knock Out, KO) pour le RE α ou le RE β ont été générées (37, 38). Ces études ont montré que mis à part le fait que l'inactivation du RE n'est pas létale, les deux RE ont des fonctions distinctes. Ainsi les souris mâles et femelles déficientes pour le RE α sont infertiles. Chez les femelles on peut noter en plus une absence d'ovulation, une hypoplasie de l'utérus, des tissus mammaires peu développés ce qui démontre le rôle fondamental du RE α dans la reproduction et le développement des caractères sexuelles (39). En ce qui concerne les souris déficientes pour le RE β , elles sont caractérisées par une fonction ovarienne diminuée induisant une fertilité réduite chez la femelle mais normale chez le mâle, le développement et la lactation des glandes mammaires sont aussi normaux, de même que l'utérus ce qui indique que le RE β n'est pas requis pour le développement des caractères sexuels mais plutôt pour une ovulation optimale (40). Des souris doubles déficientes pour le RE α et β furent également générées, elles sont viables mais infertiles chez les deux sexes comme les souris déficientes pour le RE α , elles présentent un développement des caractères reproducteurs normal chez le mâle mais déficient chez la femelle comme les souris dont le gène codant le RE α a été invalidé, et un phénotype ovarien qui ne ressemble ni au phénotype observé chez les souris RE α KO ni chez les souris RE β KO, à savoir une transdifférenciation ovarienne vers des structures ressemblant à des tubules séminifères des testicules ce qui suggère une redifférenciation (41).

1.1.5.3 Rôle dans l'os

Le développement de l'ostéoporose à la ménopause a mis en évidence le rôle de l'œstrogène dans le maintien de la densité osseuse. L'ostéoporose est due à une augmentation de la résorption de l'os, associée à une déficience en œstrogènes. Ainsi l'action de l'œstrogène via son récepteur joue un rôle dans la croissance de l'os en stimulant sa formation par les ostéoblastes (42). Le RE α a un effet anti apoptotique sur les ostéoblastes réduisant de ce fait la résorption de l'os. De plus, les souris dont le RE α a été invalidé présentent une déficience de la croissance et de la maturation osseuse alors que les souris déficientes pour le RE β ont une densité osseuse normale. L'E2 et le raloxifène sont actuellement prescrits aux femmes après la ménopause pour prévenir les fractures (8).

1.1.5.4 Rôle dans le système cardiovasculaire

Le fait que l'incidence des maladies cardio-vasculaires chez la femme soit inférieure à celle des hommes et qu'elle soit la même après la ménopause suggère que l'œstrogène exerce un effet protecteur sur le cœur (43). Ceci a été validé par les modèles animaux, chez la souris notamment, où on a montré que l'E2 prévient l'apparition de l'athérosclérose. L'utilisation des souris Knock Out a permis de démontrer que cet effet est spécifique au RE α . Des données à partir d'études cliniques suggèrent que le rôle protecteur de l'œstrogène serait en lien avec la régulation du niveau des lipides et du cholestérol, en augmentant le niveau d'HDL plasmatique (44).

1.1.6 Mécanisme d'action du RE

1.1.6.1 Mécanisme d'action classique

Le RE est un facteur de transcription activé par son ligand, ainsi les effets biologiques de l'œstrogène sur l'organisme surviennent suite à une modification de l'expression de gènes cibles spécifique du RE. Cette activité transcriptionnelle est médiée par les domaines AF1 et AF2, accompagnée d'un recrutement du RE sur le promoteur des gènes cibles directement au niveau de la séquence ERE (45).

1.1.6.1.1 Aspects moléculaires de l'activation du RE

En l'absence de ligand, le RE se trouve principalement dans le noyau sous forme de monomère lié à un complexe de protéines chaperonnes comprenant la Hsp90 et les immunophilines (46). Suite à la liaison du RE avec l'E2 au niveau du LBD, la protéine chaperonne se dissocie, le récepteur se dimérise et subit un changement de conformation, plus précisément c'est au niveau du LBD que se produit ce changement et qui passe à une forme transcriptionnellement active grâce à l'activation du domaine AF2. En effet, l'hélice 12 qui en absence du ligand pointe vers l'extérieur, se replie sur elle-même et forme une poche hydrophobe permettant le passage à une forme transcriptionnellement active du RE α (Voir Figure 3) et le complexe RE α -E2 se lie au promoteur via son DBD. Enfin, les modifications conformationnelles vont permettre l'exposition des sites de fixation sur le RE α pour les coactivateurs ou les corépresseurs qui seront recrutés et qui vont induire une augmentation ou une diminution du niveau d'ARNm et des protéines associées, se traduisant finalement par une réponse physiologique (47).

1.1.6.1.2 L'interaction directe RE-ADN

En fonction de leurs propriétés de liaison à l'ADN, les récepteurs nucléaires peuvent être divisés en trois classes. Les récepteurs de classe I représentés par les récepteurs des hormones stéroïdes dont le RE fait partie et qui comprend aussi le récepteur des androgènes (AR), des minéralocorticoïdes (MR) de la progestérone (PR) et des glucocorticoïdes (GR), ils se lient à l'ADN sous forme d'homodimère sur un élément de réponse organisé en deux séquences inversement répétées (Figure 5). Les récepteurs de classe II comprennent le récepteur de la vitamine D (RVD), le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur X rétinoïde (RXR), le récepteur activé par les proliférateurs du peroxyosome (PPAR), le récepteur X du foie (LXR) et le récepteur thyroïde (TR), ils se lient soit sous forme d'hétérodimère ou d'homodimère avec le RXR (Figure 5). La troisième classe est représentée par les récepteurs orphelins reliés à l'œstrogène (ERR) qui se lient sous forme de monomères (Figure 5) (48).

Le RE est un récepteur de classe I qui lie une séquence ERE (Figure 5), interaction rendue possible grâce à son domaine DBD. La séquence consensus de l'ERE a été décrite pour la première fois à partir de celle retrouvée sur le promoteur vitellogenin A2 du *Xenopus* (49, 50), il s'agit d'une séquence palindromique parfaite et inversée, de 13pb organisée en deux hexamères séparés par trois nucléotides de séquence aléatoire : 5'-GGTCAnnnTGACC-3'. Le génome humain contient environ 60.000 EREs, 1 par 43Kb d'ADN, toutefois seuls quelques gènes régulés par le RE possèdent un ERE parfait, pour la plupart ce sont des EREs imparfaits, non palindromiques tel que celui retrouvé sur le promoteur du gène pS2 (51) ou bien le demi ERE du promoteur de la cathepsine D (52). Le RE α se lie au ERE du vitellogenin A2 du *Xenopus* avec une grande affinité plus que sur n'importe quel autre ERE, sachant que plus l'ERE est différent de la séquence consensus, plus faible sera la liaison du RE et son activité transcriptionnelle. L'ERE peut aussi bien se retrouver au niveau de la région promotrice proximale, ou à 5Kb en amont du site d'initiation de la transcription ou encore sur des sites régulateurs distaux (47, 53).

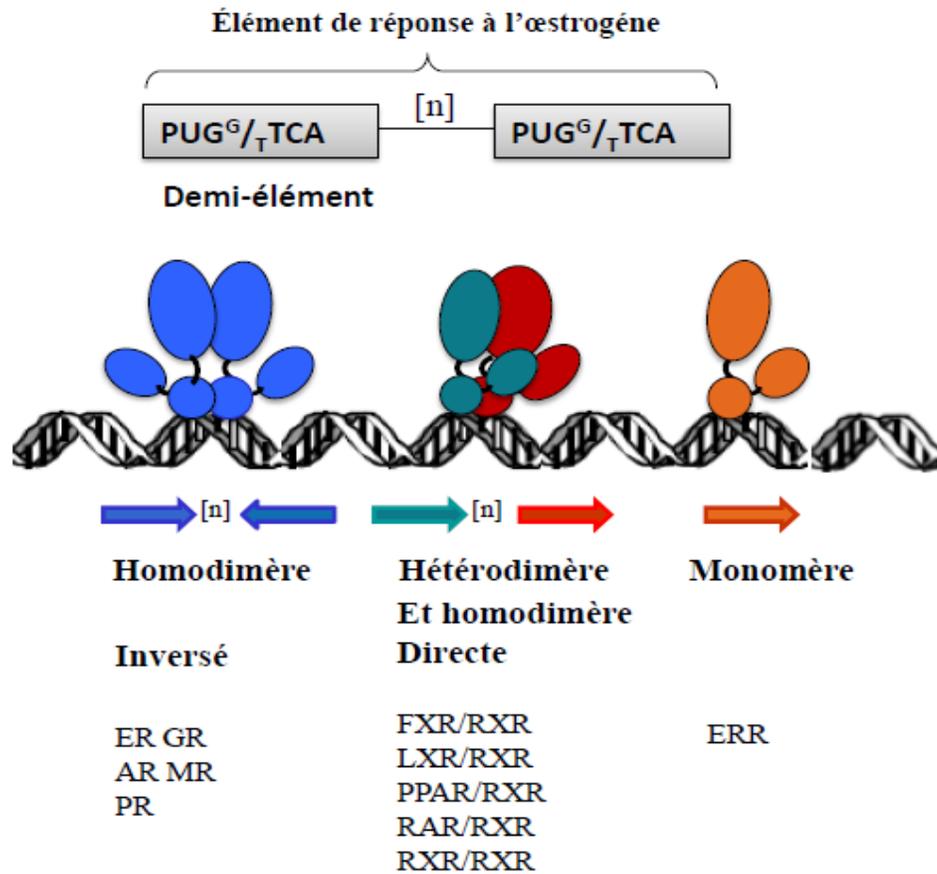


Figure 5 Différents types d'éléments de réponse à l'œstrogène reconnus par le RE.

Les rectangles en gris schématisent un demi-élément dont la séquence consensus est indiquée (n étant le nombre d'aa séparant les deux répétitions). Les flèches indiquent l'orientation de chaque demi-élément. Les récepteurs ER, GR, AR, MR et PR se lient sous forme d'homodimères sur deux séquences inversement répétées. Les récepteurs FXR, LXR, PPAR, RAR s'hétérodimérisent avec le RXR qui peut également former un homodimère et se lient sur deux séquences directement répétées. Les récepteurs orphelins ERR se lient sous forme de monomères sur un demi-élément.

1.1.6.1.3 Les Corégulateurs

Il est bien établi que le RE régule l'expression d'une multitude de gènes, mais comment peut-il activer la transcription de certains gènes et en réprimer d'autres? Le fait que son action soit tissu spécifique indique qu'il ne fonctionne pas de manière isolée. En

effet, ce rôle bivalent est rendu possible grâce à son interaction avec deux classes de corégulateurs : les coactivateurs et les corépresseurs qui sont recrutés sur le RE, mais pas seulement, car qui dit expression de gènes, implique tout un vaste complexe de facteurs à commencer par l'ARN polymérase II et les composants de la machinerie transcriptionnelle de base, accompagnés d'un remodelage de la chromatine et de modifications des histones (54) (Voir Figure 6).

1.1.6.1.3.1 Les coactivateurs

Ce sont les modulateurs positifs de l'activité transcriptionnelle du RE. En effet, chez les eucaryotes, l'ADN est empaqueté sous forme de chromatine, le nucléosome étant son unité fondamentale, formé d'un octamère de 4 cores d'histones autour duquel l'ADN est enroulé. Ces nucléosomes sont ensuite compactés en une structure dense et très organisée appelée chromatine (55). Pour que la transcription soit initiée, il faut que le promoteur soit accessible à la machinerie transcriptionnelle, ceci fait intervenir un groupe de coactivateurs formant un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant et qui vont changer l'organisation des nucléosomes tels que la famille Swi/Snf (switching mating type/sucrose non fermenting) , il y a aussi ceux qui vont induire des modifications covalentes des histones afin de décondenser la chromatine telle que la famille PRMT1 (Protein Arginine Methyl Transferase 1) ou CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyl Transferase 1) et qui possèdent (ou recrutent) des activités enzymatiques capables de modifier la chromatine telles que les acétylases et les méthylases (En vert sur la figure 6) (56-58). Ces coactivateurs ne lient pas le RE mais sont recrutés par d'autres groupes de coactivateurs qui interagissent directement avec le RE et sont impliqués dans son activité transcriptionnelle, il en existe plusieurs, les plus étudiés et caractérisés sont : SRC (Steroid Receptor Coactivator) qui appartient à la famille des protéines p160 et CBP/p300 (CREB-binding protein). Par exemple, le coactivateur SRC1, en plus de son motif LXXLL (L=Leucine et x étant n'importe quel aa) qui lui permet de lier le domaine AF2 du RE, est doté d'un domaine C-terminal d'activation de la transcription (AD1 et AD2) et d'un domaine N-

terminal à motif bHLH/PAS (basic Helix Loop Helix/PAS), ainsi AD1 va recruter des histones acétyltransférases CBP/p300 tant que AD2 interagit avec des arginines méthyltransférases PRMTs tel que CARM1 (59-61), et tous ces cofacteurs travaillent de façon synergique afin de potentialiser l'activité du RE (62).

1.1.6.1.3.2 Les corépresseurs

Le fait que les ligands naturels du RE soient des agonistes suggère que le rôle de ce facteur de transcription est d'activer l'expression de ses gènes cibles, l'existence de coactivateurs qui potentialisent son activité est donc justifiée. Toutefois, le taux physiologique d'œstrogène circulant est fluctuant, et élevé dans les tissus comme l'ovaire où il peut conduire à une activation accrue du RE, ceci à mener à l'identification de corépresseurs capables de diminuer son activité transcriptionnelle et de réguler la réponse hormonale tel que le REA (Repressor of Estrogen Receptor Activity), ou encore RIP 140 (Receptor Interacting Protein 140), ils possèdent un motif LXXLL qui leur permet d'interagir avec le domaine AF2 du RE empêchant de ce fait la liaison du coactivateur SRC1, en plus de recruter des HDACs (Histones Désacétylases) entraînant une compaction et une condensation de la chromatine, la rendant de ce fait inaccessible à la machinerie transcriptionnelle, réprimant ainsi l'expression de gènes (63).

D'autres corépresseurs ont été identifiés en premier comme étant recrutés en présence d'agonistes partiels du RE tels que l'OHT et le raloxifène, leurs permettant d'exercer leur rôle d'antagoniste dans les cellules cancéreuses du sein. Les plus étudiés et caractérisés sont SMRT (Silencing Mediator of Retinoic and thyroid hormone Receptors) (64) et le N-CoR (Nuclear Hormone Corepressor) (En rouge sur la figure 6) (65), ils possèdent une boîte CoRNR dont la séquence ressemble à celle du motif LXXLL des coactivateurs et à travers lequel ils interagissent avec les récepteurs nucléaires au niveau du domaine AF2, pour ensuite recruter des HDACs.

En résumé, l'activité transcriptionnelle du RE est régulée par tout un éventail de corégulateurs, coactivateurs comme corépresseurs (Figure 6) qui travaillent de concert et lui permettent ainsi de jouer plusieurs rôles autant physiologiques que pathologiques qu'on lui connaît. Sans oublier aussi les modifications post traductionnelles telles que la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation, l'ubiquitination qui viennent ajouter un degré de complexité à la régulation de la l'expression de gènes par le RE.

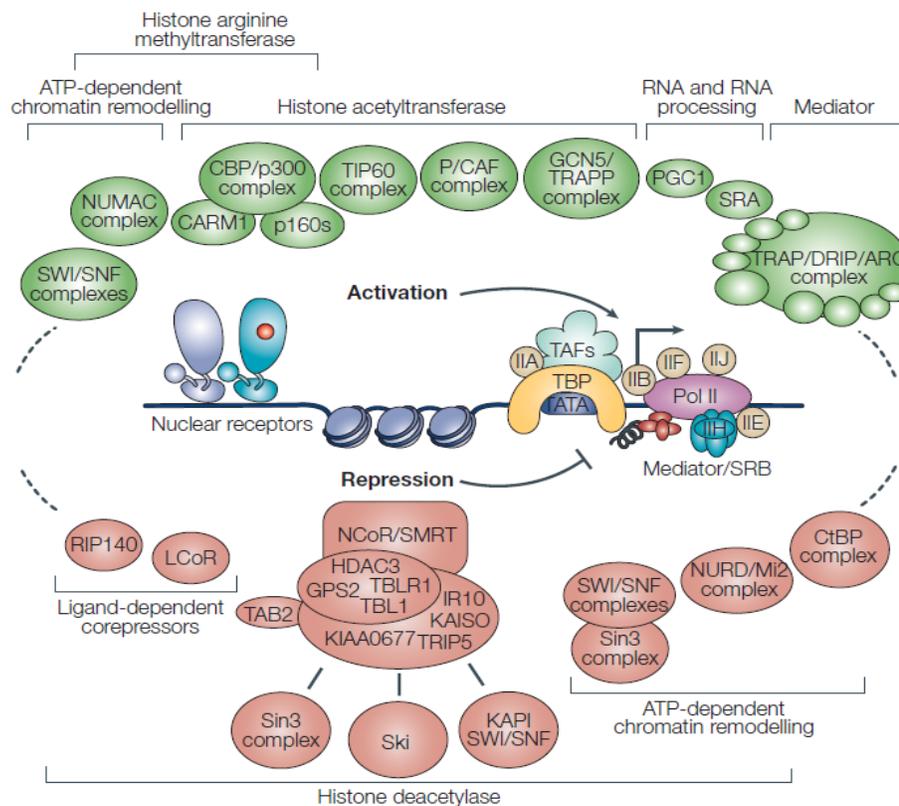


Figure 6 Représentation des différents coactivateurs et corépresseurs impliqués dans l'activité transcriptionnelle du RE. Extraite de la référence (61).

1.1.6.2 Mécanisme d'action non classique

1.1.6.2.1 Mécanisme d'action ERE-indépendant

Le fait que beaucoup de gènes régulés par le RE ne contiennent pas de séquence ERE au niveau de leurs promoteurs indique que le RE peut également se lier indirectement à l'ADN, à travers des interactions protéine-protéine, c'est-à-dire que le récepteur va s'associer à un autre facteur de transcription qui lie l'ADN, ce qui augmente la multitude de gènes pouvant ainsi être régulé par le RE. En effet, le RE est connu pour activer la transcription au niveau du site de liaison AP1 (Activating Protein 1) qui lie les facteurs de transcription Fos/Jun qui forment un complexe nommé AP-1 présent sur le promoteur de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation et le développement (66, 67). Sp1 (Specificity protein 1), est un autre facteur de transcription avec lequel le RE interagit (Figure 7B) et qui lie l'ADN au niveau de séquences riches en motifs GC présents sur les promoteurs de nombreux gènes qui répondent à l'œstrogène. Sp1 est connu pour son rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (68, 69). NF- κ B (Nuclear Factor kappa B), FoxA1, egr-1 (early growth response 1), Gata-3, CREB (cAMP response element-binding protein) sont d'autres facteurs de transcription connus qui interagissent avec le RE (70). Ce mécanisme fait aussi intervenir le recrutement de corégulateurs sur le RE. De plus, le RE peut réguler la transcription au niveau d'un promoteur possédant à la fois des EREs et des sites de liaisons pour d'autres facteurs de transcription.

1.1.6.2.2 Mécanisme d'action ligand-indépendant

Moins connu que les deux voies précédentes, ce concept n'est pas nouveau pour autant, car en 1990 l'administration d'EGF (Epidermal Growth Factor) à des souris adultes ayant subi une ovariectomie a induit les mêmes effets que ceux en présence d'œstrogène, ce qui signifie que d'autres signaux peuvent activer le RE en absence d'hormone, tels que l'EGF (Figure 7C) ou encore le TGF- β (Transforming Growth Factor beta) Ainsi, chez les souris Knock Out pour le RE α , on observe une perte de la réponse de l'E2 pour l'EGF, de

plus l'administration in vivo d'un anticorps anti EGF diminue la réponse de l'E2 au RE α ce qui signifie que la réponse de l'E2 nécessite l'EGF qui en absence de l'E2 peut mimer les effets de ce dernier (71). Ces signaux sont initiés à la surface membranaire et impliquent souvent la phosphorylation du domaine AF1 du RE au niveau de la serine 118 par des MAPKs (72).

1.1.6.2.3 Mécanisme d'action non génomique

Le fait que certaines actions de l'E2 médiées par le RE se produisent dans un laps de temps relativement court a mis en évidence l'existence d'une voie non génomique (non transcriptionnelle), cet effet ne nécessite que quelques secondes voir minutes contrairement à la voie génomique qui nécessite quelques heures. La voie non génomique requiert un RE présent dans la membrane plasmique grâce à un adaptateur ou bien attaché à la surface interne de la membrane ou tout simplement dans le cytoplasme (Figure 7D) et est défini comme étant toute action qui n'influence pas initialement et directement l'expression de gènes, elle implique la stimulation de différentes voies de signalisation telles que les MAPKs, les kinases SRC, PI3K/Akt, et IGF-1R dans le cytosol, s'ensuit l'activation de cascades de phosphorylation qui vont atteindre le noyau et activer différents facteurs de transcription, ce qui indique finalement la convergence des deux voies génomiques et non génomiques (73-77).

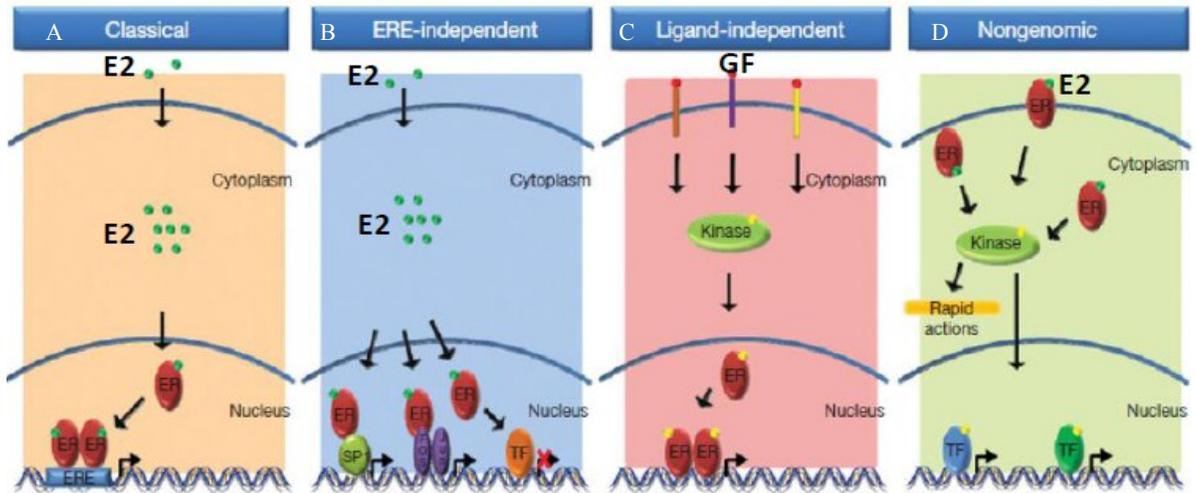


Figure 7 Résumé des différents mécanismes d'action du RE. Extraite de la référence (78).

1.1.7 Œstrogène, récepteur de l'œstrogène et cancer

1.1.7.1 Rôle dans le cancer du sein

Si le RE α -E2 joue d'importants rôles dans le développement et la différenciation des tissus reproducteurs, il est aussi connu pour son rôle crucial dans l'initiation et la progression du cancer (79-81). Les études montrent que les femmes qui prennent de l'hormonothérapie de remplacement après la ménopause notamment, ont un risque élevé de développer un cancer du sein (82-84). On sait aussi que les tumeurs expriment un niveau élevé d'aromatases leur permettant de synthétiser l'E2 localement, le résultat étant un niveau plus élevé d'E2 dans la tumeur elle-même que dans le tissu sain, alors que l'inhibition des aromatases par siRNA diminue la prolifération des cellules cancéreuses (80, 85). Le RE α peut exercer son effet tumoral de plusieurs façons, en premier, comme cela a été décrit dans la section 1.1.6, le RE est un facteur de transcription actif lorsqu'il se lie à son ligand : l'E2, ainsi le RE α activé par l'E2 (par voie génomique ou non génomique)

entraîne l'expression de gènes cibles. À titre d'exemple dans le cancer du sein, le gène LRP16 est surexprimé par le RE α et interfère avec l'expression des cadhérines qui sont alors sous-exprimées, le gène Myc qui stimule la progression du cycle cellulaire est fortement exprimé, de même que les cyclin D qui induisent la transition G1/S du cycle cellulaire ce qui se traduit par une prolifération et une croissance cellulaire accrue, augmentation des divisions cellulaires, de la synthèse de l'ADN et donc un risque élevé d'erreurs lors de la réplication et de mutations (13, 86). De la même façon, le gène Wnt11 semble être surexprimé par le RE α permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose et favorise donc la survie cellulaire (70, 87). Un autre mécanisme non génomique où l'E2 va induire la phosphorylation de molécules cibles indépendamment du RE α , ceci a été observé en premier dans les cellules qui sont négatives pour le RE α . L'E2 active le facteur anti-apoptotique AKT en le phosphorylant favorisant de ce fait la survie des cellules cancéreuses, de plus cet effet peut être bloqué par des inhibiteurs de PI3K et des kinases SRC mais pas par l'antagoniste ICI 182,780 (88). Le troisième mécanisme serait dû aux métabolites de l'œstrogène qui auraient un effet génotoxique direct induisant des dommages à l'ADN et des mutations (80, 85).

Le rôle du RE α dans le développement du cancer du sein ne date pas d'hier et a été très bien étudié. Ainsi les premières études qui s'y sont penchées ont montré une diminution de la croissance tumorale après ablation des ovaires mais seul un tiers des patientes ont répondu à la chirurgie (89). C'est la découverte du RE α plus tard qui a permis de l'identifier comme facteur prédisant la réponse à l'ablation des ovaires et le pronostic, ainsi les tumeurs positives répondront mieux que les négatives et auront un bon pronostic car elles pourront être traitées avec les anti-œstrogènes, tandis que celle qui seront négatives seront associées à un faible pronostic (90, 91). Aujourd'hui le statut du RE α a évolué et il est devenu la cible dans le traitement du cancer du sein et divers antagonistes partiels tels que le tamoxifène, le raloxifène ou bien des antagonistes pure : l'ICI 182,780 ont été mis au point pour bloquer son interaction avec l'E2. Toute fois certaines zones

d'ombre subsistent encore quant à la compréhension exacte des mécanismes d'actions, car même chez les patientes qui sont positives pour le RE α , il y a le phénomène de résistance qui survient systématiquement au bout de quelques années de traitement au tamoxifène dont l'avantage est justement de préserver le rôle bénéfique du RE α dans les autres tissus tout en antagonisant son effet dans le sein. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène et la réponse se trouve en partie dans (1) le RE lui-même à savoir qu'il peut subir une perte d'expression/fonction, (2) des mutations entraînant une hypersensibilité à l'œstradiol ou bien (3) dans son mécanisme d'action complexe (92, 93). En effet, d'une part le RE α exerce son action indépendamment de l'œstrogène en interagissant avec diverses protéines et facteurs de croissance (94, 95) et d'autre part, un déséquilibre entre l'expression de coactivateurs et de corépresseurs pourrait avoir altéré en diminuant/éliminant l'effet antagoniste du tamoxifène (96). L'E2 peut aussi initier la tumorigenèse indépendamment du RE via les métabolites génotoxique donc bloquer le RE α avec un antagoniste ne servirait à rien, altération de la biodisponibilité du tamoxifène et enfin l'existence d'un second récepteur le RE β . Pour contrer cet effet de résistance d'autres traitements alternatifs ont été développés, l'ICI 182,780 qui dégrade le RE α ou bien bloquer carrément la production de l'œstrogène par les inhibiteurs d'aromatases, sachant que les tumeurs synthétisent de l'œstrogène localement, pourrait être une avenue intéressante à titre préventif (80).

Le rôle du RE β dans le développement du cancer n'est pas très clair et assez controversé. En effet, plusieurs études réalisées sur les modèles de souris déficientes pour le RE β ont montré que les tissus les plus affectés sont l'ovaire, l'utérus et les reins alors que les effets sur la glande mammaire sont très minimes (97). Un groupe de chercheurs a montré que les souris déficientes pour le RE β exhibent une augmentation de la prolifération au niveau des alvéoles et un développement de kystes dans les seins, phénotypes n'ayant pas été observés dans les souris développés par d'autres groupes de recherche. En accord avec un rôle suppresseur de tumeurs, la plupart des études in vitro ont démontré que le RE β avait un rôle anti-prolifératif. L'hypothèse actuelle est que le RE β agit comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle du RE α (98), ainsi lorsque le RE β est surexprimé

dans des cellules, il inhibe la transcription des gènes cibles du RE α et diminue sa capacité de s'associer avec les cofacteurs. En accord avec ses observations des groupes ont démontré que le RE β inhibe la croissance cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par la régulation de l'expression de cycline D, MYC et p53 (13, 99).

1.1.7.2 Le RE et le cancer épithélial de l'ovaire

La prévalence du cancer épithélial de l'ovaire (CEO) est plus élevée chez la femme ménopausée, ce qui signifie que les changements hormonaux se produisant durant cette période confèrent un environnement favorable au développement tumoral. Ainsi durant la ménopause, on assiste à une diminution du niveau d'œstrogène et de la progestérone accompagnée d'une augmentation des niveaux des gonadotrophines LH (Luteinising hormone) et FSH (Follicular stimulating hormone). Si le rôle du RE dans le cancer du sein a été très bien étudié, très peu est connu sur son implication au niveau de l'ovaire. Certaines études suggèrent que les cycles ovariens répétitifs accompagnés de traumatismes puis réparation de la surface épithéliale de l'ovaire au cours de l'ovulation seraient impliqués dans le développement du cancer ovarien (100). Actuellement, on sait que l'utilisation d'hormonothérapie de remplacement est un facteur de risque significatif (101, 102). Un niveau élevé des gonadotrophines est associé à la progression tumorale étant donné qu'elles stimulent la stéroïdogénèse et donc augmentent la synthèse d'œstrogène. Aussi, de faibles niveaux des récepteurs hormonaux RE et PR sont associés à un faible pronostic et à une réduction de la survie chez les patientes atteintes du CEO (103-105). De façon intéressante, les différents types du CEO (Voir Section 1.2.1) exhibent différents profils d'expression du RE (106, 107) ainsi les types endométrioïdes sont RE (+) et répondent à la chimiothérapie alors que les types à cellules claires et mucineuses n'expriment pas le RE et sont ceux qui répondent le moins aux traitements. Ceci concorde avec ce qu'on observe au niveau du cancer du sein, à savoir que les tumeurs négatives pour le RE sont aussi associées à un faible pronostic et à une réduction de la survie (70).

Dans ce projet de recherche nous avons voulu étudier la régulation de l'expression du gène HYAL-1 (Hyaluronidase-1) dans le CEO, la deuxième section sera donc consacrée aux différents types du CEO et leurs caractéristiques morphologiques et moléculaires alors que la troisième section sera consacrée aux hyaluronidases.

1.2 Le cancer épithélial de l'ovaire

Le CEO est la principale cause de mortalité due aux cancers gynécologiques dans la plupart des pays développés. En raison de sa croissance asymptomatique et du manque de méthodes de dépistage efficaces, 70% des cas sont diagnostiqués à un stade avancé avec un faible pronostic et seul 30% pourront vivre 5 ans, par contre ce taux peut excéder les 90% lorsque les tumeurs restent confinées dans l'ovaire. Toute fois même si la majorité des patientes répondent très bien à la chimiothérapie au début, le taux de récurrence est élevé (environ 70%) et résulte en une diminution de la survie (108). Les tumeurs épithéliales de l'ovaire représentent 90% des tumeurs ovariennes primaires malignes, elles se forment soit à la surface de l'épithélium ovarien (SEO) ou encore à la surface de l'épithélium des kystes (109, 110). La classification du CEO est basée sur sa morphologie, ainsi en fonction du type cellulaire, il est classé en 4 types majeurs : le type mucineux, à cellules claires, endométrioïdes et séreux (Figure 8), correspondant aux différents types d'épithélium que l'on retrouve au niveau du tractus génital femelle. Ces tumeurs peuvent être subdivisées en tumeurs: bénignes (Cystadénomes), spécifiquement malignes (Carcinomes), et celles qui sont intermédiaires (Connues comme étant des tumeurs ayant un potentiel malin, faible ou à la limite de la malignité) (111, 112). Chaque type peut aussi être divisé en sous-type dépendamment de son degré de différenciation qu'on désigne par le terme de grade, les systèmes de classification les plus utilisés sont ceux proposés par la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO), l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Groupe d'Oncologie Gynécologique (GOG). À titre d'exemple, le système FIGO se base sur des critères architecturaux telle que la proportion de structures glandulaires et papillaires par rapport aux régions de croissance solides des tumeurs, ainsi

trois grades sont utilisés, grade 1, 2, 3 correspondant à une croissance solide <5%, 5–50%, et >50% respectivement (113).

Il est donc évident que le CEO est morphologiquement hétérogène avec un historique différent pour chaque type et grade, associé à des caractéristiques et à des altérations moléculaires distinctes. Toutefois, les médecins ont tendance à prescrire un seul traitement standard basé sur la chirurgie suivit d'une chimiothérapie (taxol/cisplatine), et ne tiennent pas compte des différences entre les types histopathologiques, qui auront donc différentes réponses à la chimiothérapie et un pronostic tout aussi différent d'où les faibles chances de survie et les difficultés pour traiter ces cancers de façon efficace (106). Aujourd'hui, l'émergence de nouvelles techniques permettant l'étude du profil d'expression d'une multitude de gènes a permis d'identifier certains gènes comme étant préférentiellement exprimés dans certains types, alors que d'autres sont souvent mutés, permettant d'associer chaque type avec des caractéristiques génétiques et des altérations moléculaires distinctes, en plus des différences morphologiques connues (114). Des modèles de souris ayant des carcinomes ovariens ont aussi été développés et récapitulent plusieurs aspects morphologiques et moléculaires du CEO (115) et vont permettre de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

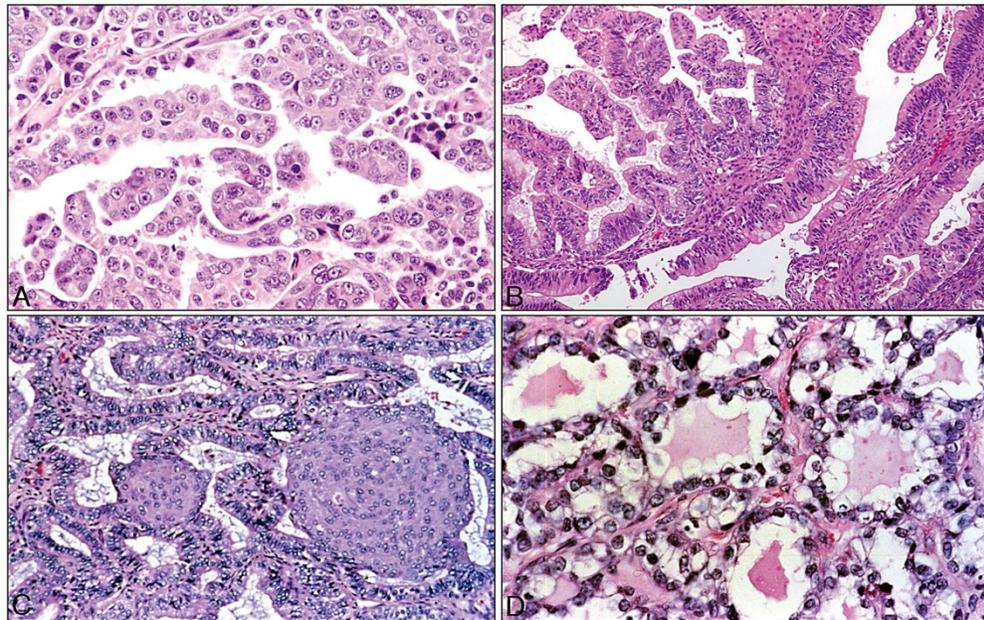


Figure 8 Représentation des 4 types histopathologiques majeurs du CEO.

(A) Carcinome de type séreux, (B) Carcinome de type mucineux, (C) Carcinome de type endométrioïdes, (D) Carcinome à cellules claires. Extraite à partir de la référence (116).

1.2.1 Caractéristiques des 4 types histopathologiques du CEO

1.2.1.1 Le CEO de type séreux

Ce sont les carcinomes les plus communs avec plus de 70% de cas. Du point de vu morphologique, ils sont caractérisés par des tumeurs larges formées d'un mélange de papillaires, de kystes et de croissance solide avec des espaces sous forme de fentes, des atypies nucléaires et une forte activité mitotique (117). On retrouve les tumeurs de faible grade et de grade élevé, et contrairement aux croyances populaires, les tumeur de grade élevé ne dérivent pas des tumeurs de faible grade mais seraient deux types distincts. Au niveau moléculaire, les tumeurs à grade élevé sont associées à des mutations du gène TP53 (Tumor Protein 53) dans plus de 50% des cas avec une surexpression de la protéine p53 (118), ces mutations sont présentes dès le premier stade ce qui suggère qu'elles se

produisent très tôt durant le développement des carcinomes séreux. Pour les tumeurs à faible grade, le gène TP53 n'est pas muté mais des mutations des gènes KRAS (Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog) ou BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog) ont été identifiés dans 2 tiers des cas accompagnées d'une activation des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) (119). Des mutations du gène ERBB2 ont également été observées mais sont rares dans les tumeurs à grade élevé. D'autres gènes tels que BRCA1/2 (Breast Cancer 1/2), PTEN (Phosphatase and tensin homolog), et PIK3CA sont aussi mutés mais moins fréquemment par contre.

1.2.1.2 Le CEO de type endométrioides

L'association entre le CEO de type endométrioides et les carcinomes de l'endomètre est bien établit, les deux se ressemblent morphologiquement et l'endométriose est maintenant considérée comme étant le précurseur du CEO de type endométrioides. Ce type de cancer constitue 7%, la majorité de ces tumeurs sont de faible grade et de stade et reste confinée au niveau de l'ovaire, on les reconnaît par la présence d'éléments de l'épithélium et du stroma qui ressemblent à ceux retrouvés dans l'endomètre, et aussi par la présence de régions d'adhésion fibreuses denses (120). Des mutations de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN sont observées à commencer par la voie de signalisation des WNT/ β -catenins connue pour être impliquée dans divers processus telles que la différenciation, la survie et la prolifération est dérégulée dans la majorité des cas en raison de l'inactivation du gène CTNNB1 qui encode pour la β -caténine. Toutefois cette mutation est associée à des tumeurs de faible grade et à un pronostic favorable. Des mutations inactivant le gène suppresseur de tumeurs PTEN qui est muté dans la plupart des tumeurs humaines, ont également été rapportées dans les tumeurs de type endométrioides de façon très fréquente mais sont rares dans les autres types de cancers épithéliaux ovariens tout comme celle du gène CTNNB1 (114). Le gène PTEN encode pour une protéine dont le substrat est PIP-3 (3, 4,5-triphosphate) et qui jouerait un rôle crucial de sa fonction de suppresseur de tumeurs. En effet, il a été rapporté que cette

molécule lipide est le second messenger régulant la phosphorylation de la protéine AKT et ces molécules cibles en amont qui affectent le cycle cellulaire et l'apoptose, ainsi une dérégulation du gène PTEN induit une prolifération accrue des cellules qui échappent à l'apoptose (121).

1.2.1.3 Le CEO à cellules claires

Ce type de cancer représente moins de 5%, comme son nom l'indique, il est caractérisé par des cellules claires avec un large cytoplasme clair riche en glycogène. La croissance des cellules est soit tubulaire, papillaire, solide ou un mélange des 3, la plupart des tumeurs sont solides formées de kystes associées à des nodules (110). Mis à part ces caractéristiques morphologiques, les tumeurs à cellules claires présentent un profil d'expression de gènes qui sont préférentiellement exprimés dans ce type et qui permet de le distinguer des autres types histopathologiques tels que HNF-1 β (Hepatocyte Nuclear Factor-1 beta), glutathion peroxydase 3, annexine A4, ERCC1 et XPB, deux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (122). Parmi tous ces gènes surexprimés, HNF-1 β semble être spécifique aux carcinomes à cellules claires, ce gène encode pour une protéine à homéo domaine régulant l'expression de plusieurs gènes dans différents tissus, de façon intéressante HNF-1 β control l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glycogène retrouvé au niveau du cytoplasme et qui lui confère sa caractéristique de cellules claires. De plus, la sous-expression de HNF-1 β dans les carcinomes à cellules claires induit l'apoptose ce qui suggère qu'il est essentiel à la survie des cellules cancéreuses (123). En raison de sa rare prévalence, ce type de tumeur n'a pas été très étudié et les événements moléculaires qui sous-tendent sa formation et son développement ne sont pas très bien connus. Le gène TP53 n'est pas muté ce qui indique que d'autres mécanismes anti apoptotiques sont impliqués dans le la progression de ce type de carcinome. Toute fois des mutations de PIK3CA qui code pour la sous-unité PI3K (phosphoinositide 3-kinase) sont fréquentes. De plus, une perte d'expression de PTEN induisant une activation de la progression du cycle cellulaire est souvent observée. Ce genre

de tumeurs sont associées à un faible pronostic et sont résistantes au traitement standard (124).

1.2.1.4 Le CEO de type mucineux

Aussi rare que le type précédent avec une prévalence de moins 3%, ce sont les tumeurs les plus larges, on les reconnaît entre autre par des kystes irréguliers et des glands bordés par des cellules épithéliales mucineuses car contenant un mucin intracytoplasmique abondant (120). Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant spécifiques aux carcinomes mucineux par exemple les gènes mucin (MUC 2, MUC 3 et MUC 17), étant donné que les carcinomes mucineux exhibent une différenciation de type intestinale, des marqueurs de différenciation intestinale sont aussi retrouvés, par exemple, les facteurs de transcription à homéodomaine : CDX1 et CDX2, LGALS4 (galectin 40) qui encode pour des molécules d'adhésion à la surface cellulaire intestinale (125). Les mutations de KRAS sont les plus fréquentes se produisant dans plus de 50% des cas (121, 126).

En résumé, il serait plus approprié de considérer le CEO non pas comme une seule maladie à plusieurs facettes mais plutôt en tant que plusieurs pathologies distinctes nécessitant des traitements individuels.

1.3 Les hyaluronidases

1.3.1 Classification

C'est une famille d'enzymes largement distribuée au sein du règne animal, elles ont été identifiées pour la première fois à partir d'extraits de testicules de mammifères qui contenaient des facteurs permettant la diffusion de vaccins antiviraux. Le terme hyaluronidases fut introduit par la suite par Meyer K en 1952 (127) pour désigner ces

facteurs comme étant des enzymes qui dégradent l'acide hyaluronique (HA), se basant sur des analyses biochimiques, il les a classées en trois groupes en fonction de leurs différents mécanismes d'action et des produits générés. Le premier groupe est représenté par les hyaluronidases mammifères (E.C. 3.2.1.35) qui sont des endo- β -N-acetyl-hexosaminidases, elles clivent les liens β 1,4 du HA et dans une moindre mesure les sulfate de chondroitines pour générer principalement des oligosaccharides (tétrassaccharides et hexasaccharides). La deuxième classe comprend les hyaluronidases retrouvées chez les sangsues et l'ankylostome, ce sont des endo- β -glucuronidases (EC 3.2.1.36) qui clivent les liens glucuronate du HA et dont les produits finaux sont des tétrasaccharides et des hexasaccharides, et en fin les hyaluronidases bactériennes (E.C.4.2.99.1) forment le troisième groupe (128, 129).

1.3.2 Organisation génomique

Il existe dans le génome humain six séquences paralogues de type hyaluronidase, partageant 40% d'identité entre elles (Figure 9) avec une distribution tissulaire unique pour chaque gène. Ces six gènes sont organisés en groupe de trois sur deux chromosomes distincts, ainsi sur le chromosome 3p21.3 sont retrouvés *HYAL-1*, *HYAL-2* et *HYAL-3* et sur le chromosome 7q31.3 on retrouve *HYAL-4*, *PH-20/SPAM1* et *HYALP1* qui est un pseudogène. L'organisation génomique des trois hyaluronidases situées sur le chromosome 3p21.3 est similaire avec quelques différences, par exemple *HYAL-1* possède un intron supplémentaire dans l'exon 1 qui n'est pas présent dans les deux autres séquences *HYAL-2* et *HYAL-3* (Figure 10). En parallèle, la souris possède sept gènes paralogues de type hyaluronidases regroupés sur deux chromosomes, comme chez l'humain, on retrouve *Hyal-1*, *Hyal-2* et *Hyal-3* sur le chromosome 9F1, tandis que *Hyal-4*, *Ph20/Spam1*, *HyalP1* sont localisés sur le chromosome 6A2 où on retrouve aussi le 7^e gène *Hyal-5* qui n'est pas présent chez l'humain (Figure 9). La séquence est bien conservée entre les hyaluronidases orthologues humaines et de souris avec un degré d'homologie plus élevé que celui entre les six gènes paralogues des hyaluronidases humaines (130, 131).

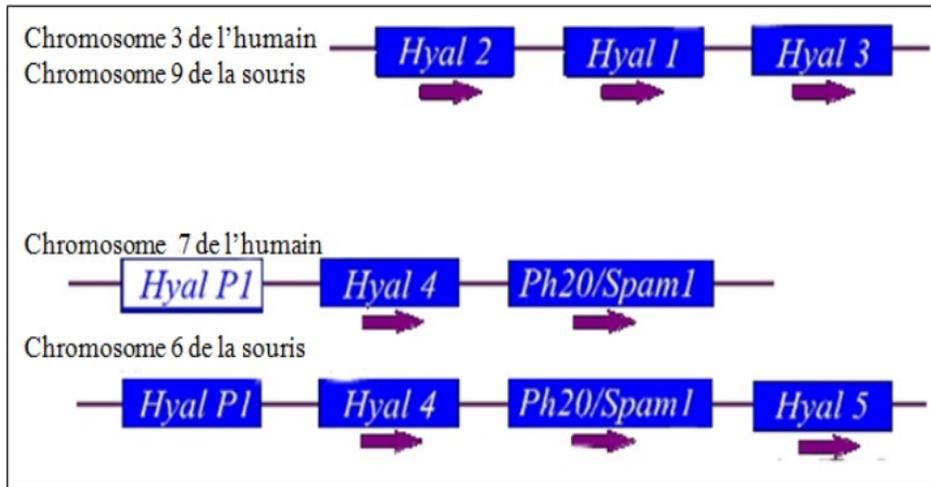


Figure 9 Arrangement chromosomique des différents gènes hyaluronidases chez l'humain et la souris.

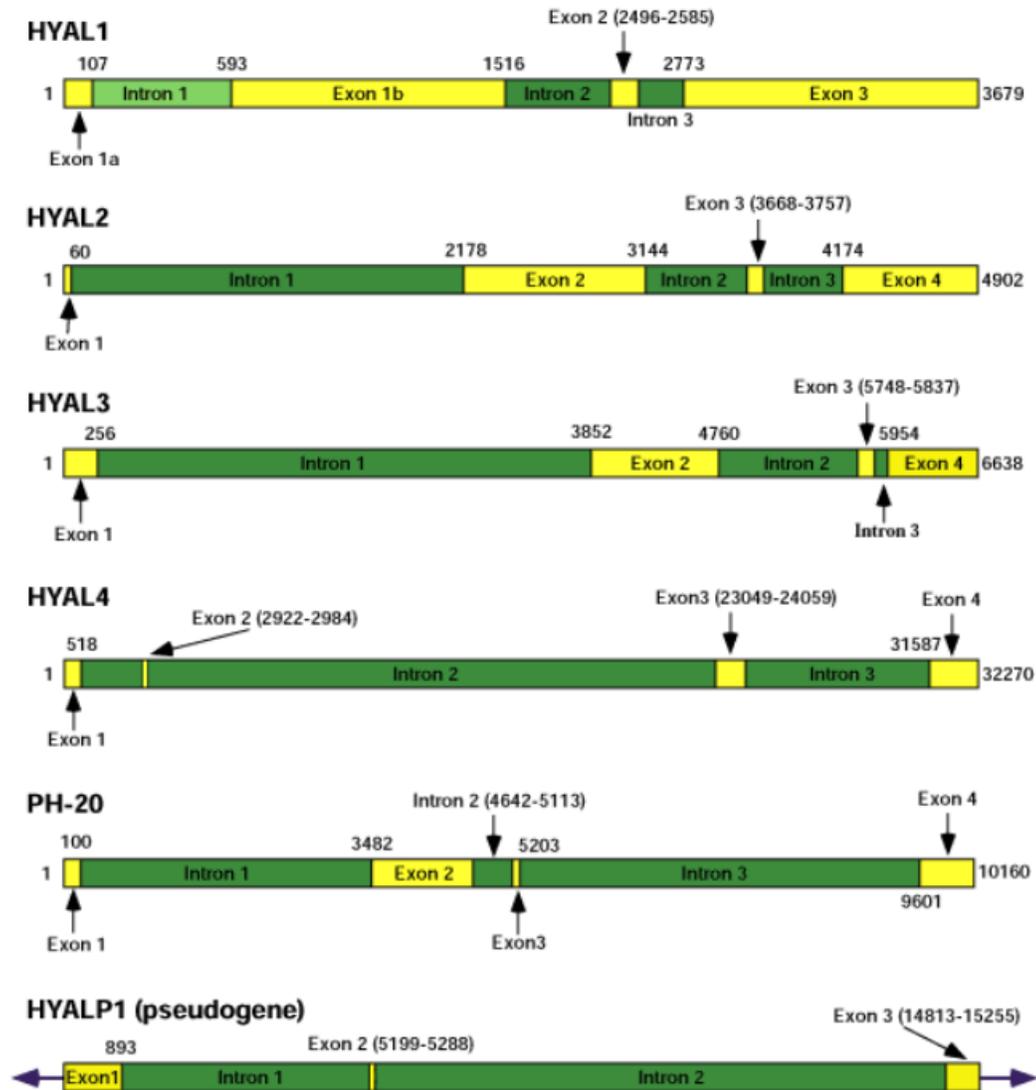


Figure 10 Les gènes codants les hyaluronidases humaines.

Les exons sont indiqués par les rectangles jaunes et les introns par des rectangles verts.
 Extraite à partir de : <http://www.glyco.forum.gr.jp>.

1.3.3 Caractéristiques et rôles physiologiques des hyaluronidases mammifères

Toutes les hyaluronidases possèdent un peptide signal (SP) à l'extrémité N-terminal, un domaine catalytique qui hydrolyse le HA, et un domaine variable à l'extrémité C-terminal (Figure 11). Ce domaine C-terminal contient des séquences EGF-like pour HYAL-1 et HYAL-2, et un domaine de liaison à la zone pellucide ZPB (Zona pellucida binding) pour PH20 et Hyal-5. HYAL-2, PH20. Hyal-5 possède en plus un domaine d'ancrage GPI (Glycosylphosphatidil-inositol) (Figure 11) requis pour lier l'enzyme à la surface externe de la membrane plasmique (132).

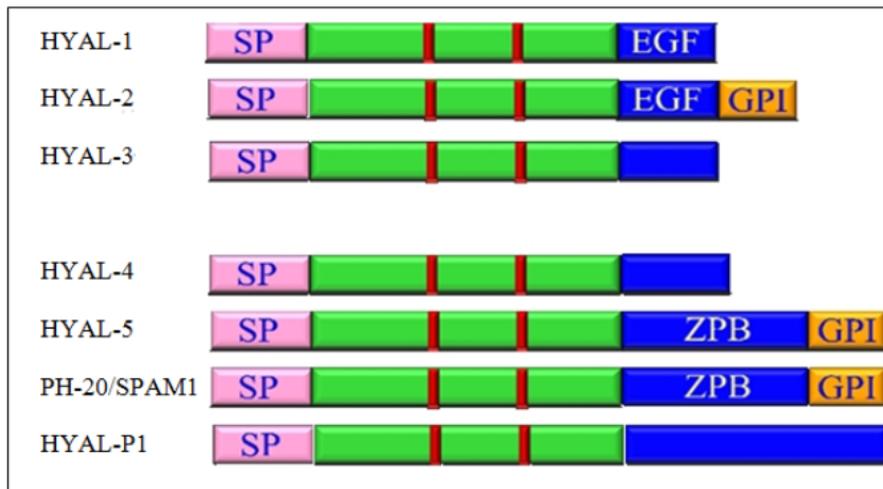


Figure 11 Les différents domaines protéiques des hyaluronidases.

Les rectangles rouges représentent les résidus catalytiques (Glu145 et Asp147, chez Hyal-1 de la souris) et les résidus importants pour la position du substrat (Tyr218, Tyr263 et Trp339). SP= peptide signal, EGF= similaire à l'épidermal growth factor, GPI= glycosylphosphatidil-inositol, ZPB= zona pellucida binding.

La distribution tissulaire des hyaluronidases semble être reliée à leurs localisation chromosomique ainsi HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3 situées sur le même chromosome sont exprimées de façon ubiquitaire (dans tous les tissus). HYAL-1 et HYAL-2 sont les principales hyaluronidases somatiques et sont connues tant pour leurs rôles physiologiques que pathologiques, par exemple dans la cicatrisation des blessures, l'inflammation et l'ostéoarthrite. Alors que les 3-4 autres hyaluronidases sont regroupées sur le même chromosome et sont principalement retrouvées dans le système reproducteur mâle.

HYAL-1 est la première hyaluronidase à avoir été purifiée, clonée et séquencée en 1997 par Frost et *al* (133, 134) à partir du plasma humain sous forme d'une protéine de 57kDa formée d'une chaîne polypeptidique de 49 kDa avec 8 kDa de modifications post traductionnelles : la glycosylation, elle partage 40% d'homologie avec son homologue PH-20 présent au niveau du sperme. L'orthologue de la souris fut également cloné la même année et possède 73% de similitude avec l'enzyme humaine. HYAL-1 est active à pH acide et est retrouvée en majorité dans le foie, la rate, le cœur et les reins. Une isoenzyme de 47 kDa fut aussi identifiée, clonée et séquencée à partir des urines connus pour contenir une forte concentration de hyaluronidases (135), ayant la même séquence que HYAL-1 mais plus courte avec 100 acides aminés manquants au niveau C-terminal. La structure cristalline de HYAL-1 a identifié deux domaines fonctionnels distincts : un domaine catalytique principal et un domaine EGF-like du côté C-terminal probablement impliqué dans les interactions protéine-protéine (Figure 11) (136). L'implication des hyaluronidases dans la dégradation de l'acide hyaluronique fut confirmée par le fait que les patients souffrant de mucopolysaccharidose, caractérisée par une accumulation de glycosaminoglycanes, présentent une déficience d'activité hyaluronidase dans le sérum (137). Plus tard, des mutations identifiées sur le gène HYAL-1 ont mis en évidence que c'est la déficience en HYAL-1 qui est à l'origine de la mucopolysaccharidose chez ces patients, elle est associée à une augmentation significative du HA sérique (138). Chez la souris, un modèle de la mucopolysaccharidose fut généré, ces souris-là ont un phénotype moins sévère mais similaire à celui observé chez les patients avec une perte précoce de protéoglycanes dans le cartilage des articulations et une accumulation de HA dans le

cartilage typique de l'ostéoarthritis (139). Récemment nous avons aussi démontré que HYAL-1 est un important régulateur du développement folliculaire impliqué dans la voie de signalisation des follistatines/activines/Smad3 (140). (Il est à noter que je suis première co-auteure dans cet article Epub 2011, où j'ai travaillé dans ce projet aussi pendant ma Maîtrise).

Une autre hyaluronidase, HYAL-2, on la retrouve ancrée à la membrane plasmique de certaines cellules par des liaisons GPI (Figure 11), également active à pH optimum acide et très répondeuse aussi. Le cDNA codant HYAL-2 a été isolé et caractérisé à partir de la souris et du xenopus levis, comme HYAL-1 son rôle consiste à dégrader l'acide hyaluronique, mais ses produits de dégradation sont de haut poids moléculaire (fragments d'environ 20 kDa), de plus son activité enzymatique est beaucoup plus faible que celle de HYAL-1 et PH20. HYAL-2 joue un rôle dans l'embryogenèse et est considérée comme la plus importante des hyaluronidases étant donné que sa délétion chez les souris est létale (141), alors les souris déficientes en HYAL-1 et HYAL-3 sont viables (139). Chez l'humain, elle sert aussi de récepteur pour le rétrovirus de Jaagsiekte du mouton (142, 143).

Largement exprimée comme les deux premières hyaluronidases mais moins connue par contre, HYAL-3 ne semble pas avoir d'activité hyaluronidase puisque les souris qui en sont déficientes ne montrent aucune accumulation de HA (144). Elle est présente dans les chondrocytes, fibroblastes et dans les testicules sans pour autant qu'un rôle précis lui soit associée (145).

PH20 également connue sous le nom de SPAM1 (sperm adhesion molecule 1) est la hyaluronidase du système reproducteur male localisée sur le chromosome 7q31 chez l'humain et 6A2 chez la souris. C'est la plus étudiée notamment pour son rôle nécessaire dans la fertilisation. En effet, on la retrouve au niveau des spermatozoïdes plus exactement à leur surface grâce à son ancrage GPI (Figure 11) mais aussi dans l'acrosome où elle facilite la pénétration dans l'ovocyte en dispersant la couche cumulus qui entoure l'ovocyte par hydrolyse du HA, permettant de ce fait la fécondation (146). Elle est active aussi bien à pH acide qu'à pH neutre. En plus de son rôle de hyaluronidase, son action implique la

transduction de signaux intracellulaires initiés par différents récepteurs de surface (147, 148).

Sur le même regroupement de chromosome que la PH20, on retrouve également HYAL-4 et HYALP1 également exprimés dans les testicules. Chez l'humain PH20 est la seule hyaluronidase fonctionnelle dans cette région chromosomique étant donné que HYALP1 est un pseudogène alors que HYAL-4 est une chondroitinase qui dégrade les sulfates de chondroitines, par contre chez la souris Hyalp1 code pour une protéine et le 7^e gène Hyal-5 pour une autre protéine, les deux étant exprimées dans le sperme et ont un rôle similaire à celui de PH20 dans la fécondation (149).

1.3.4 L'acide hyaluronique

Le substrat des hyaluronidases est l'acide hyaluronique (HA) ou hyaluronan, c'est un glycosaminoglycane de haut poids moléculaire formé par la répétition d'unités dissaccharidiques d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine [-D-acide glucuronique- β 1,3-Nacetyl-D-glucosamine- β 1,4-] $_n$ (Figure 12). Il est synthétisé par des enzymes appelées HA synthase (HAS; EC 2.4.1.212) (150).

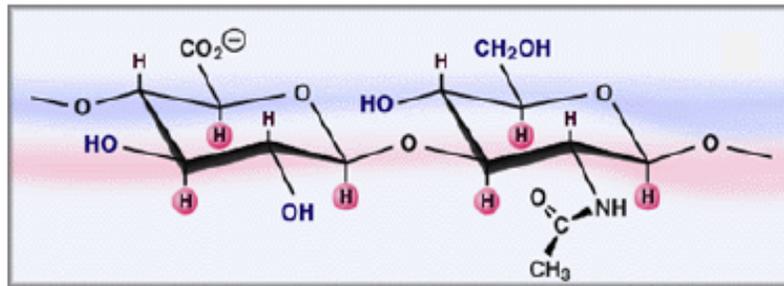


Figure 12 Représentation de la structure du HA. Extraite de la référence (151).

Le HA est le majeur constituant de la matrice extracellulaire (MEC), on le retrouve dans la plupart des tissus chez les mammifères. Différents rôles physiologiques lui ont été attribué, notamment au niveau structural grâce à ces caractéristiques hydrodynamiques, dans la lubrification, l'homéostasie, l'hydratation et le remodelage des tissus et sert aussi de filtre permettant le passage des petites molécules (152, 153). Le HA a cependant attiré l'attention plus pour son implication dans le cancer (154, 155), car grâce à ses propriétés, il confère une certaine malléabilité et porosité à la MEC la rendant de ce fait permissive à la migration et à l'invasion tumorale (156-158). En plus d'avoir un rôle direct, en effet, il a été rapporté par de nombreuses études que le HA, via son interaction avec des récepteurs de surface : le CD44 ou RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility), est un point d'ancrage pour les cellules tumorales favorisant l'adhésion des cellules tumorales, l'invasion et les métastases (157). Dans le cancer de l'ovaire notamment où l'adhésion des cellules tumorales à la couche d'HA pericellulaire des cellules mésothéliales joue un rôle crucial dans la propagation des carcinomes ovariens (159). De plus, la liaison du HA au CD44 va activer des protéines du cytosquelette telles que les ankirines et les rhoGTPases entraînant l'activation d'autres voies de signalisation impliquant les voies de signalisations anti-apoptotiques PI3-AKT, des MAPKs aboutissant à la fin à l'initiation et à la progression tumorale (156, 158). En accord avec ces observations, des concentrations élevées de HA sont retrouvées dans différents cancers (155, 160, 161). Le HA joue également un rôle dans l'angiogenèse, en fait ce sont les petits fragments de HA de faible poids moléculaire générés suite à sa dégradation par les hyaluronidases qui seraient angiogéniques (151, 162, 163). Il a été observé que des petits fragments de HA d'une certaine taille d'environ 10-15 disaccharides favorisent la prolifération des cellules endothéliales et la formation de capillaires en induisant l'expression de facteurs angiogéniques tel que FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) (164, 165). Ces mêmes fragments de HA sont retrouvés dans les urines de patients atteints de cancer de la vessie où ils servent de marqueurs permettant la détection des tumeurs (165).

1.3.5 Les hyaluronidases et le cancer

Le rôle des hyaluronidases dans le cancer est assez controversé. En effet, certains leurs ont attribué un rôle de suppresseurs de tumeurs, notamment en raison de leurs localisation au niveau du chromosome 3p21.3 connu pour être une région de gènes suppresseurs de tumeurs. Dans les cancers de la tête, de la langue, du cou et du sein, des délétions d'allèles sont fréquemment observées (166-168). De plus, dans le cancer de l'ovaire des déséquilibres alléliques ont aussi été retrouvés au niveau des trois gènes hyaluronidases (169), accompagnés d'une diminution de l'ARNm de HYAL-1 dans les CEO de type séreux (170) et associés à une augmentation du niveau d'HA, dont le rôle dans le cancer a été discuté précédemment et qui vient donc confirmer cette hypothèse. Par contre, plusieurs autres évidences sont en faveur d'un rôle de promoteur de tumeurs, à savoir que des niveaux élevés de HYAL-1 ont été observés dans différents types de cancer du cou, de la tête, du sein et dans les glioblastomes, où ils favorisent la progression tumorale et corrélent avec le caractère malin de ces cancers (155, 171, 172). Dans le cancer de la prostate, de la vessie et du sein entre autre, il a été démontré que HYAL-1 stimule la progression du cycle cellulaire par la surexpression de régulateurs positifs tels que cdc25c, cycline B1, de ce fait, l'inhibition de l'expression de HYAL-1 par RNA interférence a induit une diminution de la prolifération et de l'invasion des tumeurs en bloquant le cycle cellulaire en phase G2-M dans les lignées cellulaires de ces mêmes types cancéreux (173-176). Inversement, la surexpression de HYAL-1 dans le cancer du sein a entraîné une augmentation de la croissance, la prolifération, l'invasion tumorale et de l'angiogénèse (177) et concorde avec le fait que ce sont les petits fragments d'HA générés par les hyaluronidases qui sont angiogéniques. Sachant que les niveaux élevés de HYAL-1 sont retrouvés dans les tissus alors que ceux du HA sont présents dans les tumeurs du stroma, ce qui indique un dialogue entre les deux tissus. Par conséquent, le niveau d'expression des hyaluronidases peut varier en fonction du type de tumeurs et de son niveau de malignité.

1.4 Hypothèse et objectifs

Notre laboratoire étudie le rôle des enzymes hyaluronidases dans le cancer épithélial de l'ovaire. Des résultats récents nous ont permis de démontrer que l'expression de l'ARNm de HYAL-1 était élevée dans les lignées cellulaires et chez les patientes avec COE de type mucineux et à cellules claires mais pas dans les types endométrioïdes et séreux (107), (Article où je suis deuxième co-auteure). Ces résultats ont été validés par deux techniques, q-RT-PCR sur une cohorte d'échantillon et par microarray sur une autre cohorte. Les seules études ayant été faites dans le passé sur l'expression de HYAL-1 dans le CEO se sont concentrées sur le type séreux et notre laboratoire a été le premier à avoir analysé et comparé l'expression de ce gène dans les 4 types majeurs du CEO. Même constat avec l'activité enzymatique qui était aussi élevée dans les lignées cellulaires du CEO à cellules claires et mucineuses et dans le sérum des patientes avec ces cancers. Intéressant aussi, cette expression élevée de HYAL-1 est inversement corrélée avec celle du RE α (107). Le RE α est un facteur de transcription qui régule l'expression d'une multitude de gènes, soit en les activant ou au contraire en inhibant leur expression.

Notre hypothèse de recherche est donc que HYAL-1 est négativement régulé par le RE α . L'objectif principal du projet étant de caractériser le mécanisme de cette régulation dans la lignée TOV21G qui dérive du CEO à cellules claires et aussi dans la lignée du cancer du sein la MCF-7 (largement utilisé pour les études du RE α).

Pour répondre à la question, en premier nous avons analysé l'expression de HYAL-1 après transfection du RE α dans la lignée TOV21G et après traitement avec l'œstrogène dans la lignée MCF-7, puis évalué le recrutement du RE α sur le promoteur de HYAL-1 par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et par des essais luciférase.

2 Matériels et méthodes

2.1 Lignées cellulaires

Les cellules TOV21G dérivent des carcinomes de l'ovaire à cellules claires, elles sont HYAL-1 (+) mais RE α (-), ces cellules sont cultivées dans un milieu OSE (Ovarian Surface Epithélium) (Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) avec 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) et antibiotiques: pénicilline/streptomycine 0.5% (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) et amphotéricine B 0.25% (Invitrogen), les cellules MCF-7 (Michigan Cancer Fondation) sont des cellules du cancer du sein qui sont RE α (+) mais qui expriment un niveau faible de HYAL-1, elles sont maintenues dans un milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Wisent Inc., St-Bruno, QC, Canada) avec 10% de FBS et antibiotiques.

2.2 Culture cellulaire et transfection transitoire

Les cellules TOV21G sont cultivées à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO₂, dans des plaques 6 puits, avec un milieu DMEM-F12 supplémenté de 10% de FBS, de sorte à ce qu'elles soient à 70% de confluence deux jours plus tard. Les cellules sont transfectées en incubant le gene juice (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) avec 100 μ l de DMEM, 5 min avant d'ajouter l'ADN pour un ratio de 1 μ g/3 μ l de gene juice, 15 min plus tard le mélange est rajouté aux cellules auxquelles on aura remplacé le milieu au préalable par un milieu DMEM F-12 sans sérum ni antibiotiques, le lendemain on change le milieu de transfection pour un milieu complet.

Pour l'essai q-RT-PCR dans la lignée TOV21G, les cellules ont été mises en culture dans un milieu DMEM-F12 avec phénol rouge et FBS complet, les deux contiennent de l'œstrogène, après la transfection, les cellules n'ont donc pas été traitées avec l'E2. Par contre, pour les essais luciférase, les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM-F12 sans phénol rouge avec 10% de FBS décomplémenté et desteroïdé par un traitement avec

du dextran T75 et du charbon activé, afin d'éliminer l'œstrogène, après la transfection les cellules ont donc été traitées avec 10nM d'E2 pendant 16h.

2.3 Western blot

Les culots cellulaires ont été repris dans un tampon de lyse (25mM Tris HCL pH 7.5, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X100 et 1x PIC) et incubés 30 min sur glace puis centrifugés 5min à 4°C, le surnageant est récupéré pour mesurer la concentration en protéine avec la méthode BRADFORD (BioRad Protein Reagent ; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.), 30µg ont été chargés sur un gel SDS-PAGE 12% dans des conditions dénaturantes, dans un tampon de migration. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane en nitrocellulose dans un tampon de transfert à 250mA pendant 70min à 4°C. Afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques, la membrane est incubée dans du lait 5% avec TBS, o/n à 4°C. Le lendemain la membrane est incubée avec un anticorps anti RE α (H-184, 1:500, anticorps de lapin; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o/n à 4°C ou avec un anticorps anti β -actin (pan Ab-5, 1:1500, anticorps de souris; Lab Vision Corp., Fremont, CA). La membrane est ensuite incubée 1h à T° pièce avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase anti-IgG de lapin (1:3000, anticorps de chèvre; Bio-Rad) ou un anticorps anti IgG de souris couplé à la peroxydase (1:1000, anticorps de chèvre; Sigma) respectivement. La révélation a été réalisée en utilisant le Kit Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer, Boston, MA) et le Fuji LAS-3000 avec le logiciel MultiGauge2.0.

2.4 Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel

L'ARN a été extrait en utilisant le kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Sunnyvale, CA) selon les instructions fournies par le fabricant, puis 1µg a été utilisé pour la synthèse des ADNc avec le kit iScript™ cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories). 5µl d'ADNc dilué 10x ont été utilisés pour chaque réaction de PCR en temps réel en

utilisant des amorces spécifiques pour chaque transcrit (Tableau I). Le niveau d'expression de l'ARNm a été évalué en utilisant le Platinum SYBR Green Q-PCR supermix UDG (Invitrogen). La fluorescence est capturée en utilisant le iCycler iQ real-time detection system (BioRad Laboratories) et le Programme suivant : 50°C pendant 2 minutes (Incubation), 95°C pour 3 minutes (Dénaturation), 50 cycles de 95°C/30 sec, 58°C/30 sec et 72°C/45 sec, suivit d'une courbe de fusion durant 70 cycles avec une augmentation de la température de 0.5°C/cycle, commençant à 60°C. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'actine, et analysés en utilisant la méthode du $1/2^{\Delta Ct}$ où $\Delta Ct = Ct \text{ du gène} - Ct \text{ actine}$. Les échantillons ont ensuite été migrés sur gel d'agarose 2% pour s'assurer de la spécificité des amorces utilisées et l'expérience est faite en triplicata.

Tableau 1 Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par q-RT-PCR.

Gène	Amorces	Taille des produits	Référence
HYAL-1	AAGCCCTCCTCCTCCTTAACC AGCCAGGGTAGCATCGAC	300 pb	(107)
ERα	TGGGCTTACTGACCAACCTG CCTGATCATGGAGGGTCAAA	280 pb	ce travail
pS2	TGGAGAACAAGGTGATCTGCG CGAAACAGCAGCCCTTATTTGC	350 pb	(107)
GREB-1	TTCCCCGAAGTGCCAACAAC ATGGAGATTCTGGAGACCACCC	280 pb	(107)
β-actin	GTGGGCTCTAGGCACCA TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG	239pb	ce travail

2.5 Genome wide scan des sites de liaison du RE α

Cette stratégie est basée sur la combinaison de la technique de ChIP conventionnelle avec des microarray c'est ce qu'on appelle le ChIP on chip. En effet, le principe consiste à analyser les fragments d'ADN obtenus par ChIP sur une puce à ADN (Microarray) sur laquelle on aura déposé au préalable de l'ADN génomique ou des oligonucléotides correspondants à des séquences promotrices (178). Nous avons accédé aux banques de données disponibles publiquement pour les sites de liaison du RE α dans des études de ChIP on chip en utilisant la cellule du cancer du sein MCF7 après traitement avec E2 (179-181). Dans ces papiers ils ont cartographié les sites de liaison du RE α et identifié des sites proximaux situés jusqu'à 50Kb en amont du site d'initiation de la transcription mais aussi d'autres sites distaux. La plupart de ces sites contiennent des EREs complets et certains sont des demi-éléments. Pour nos recherches, nous nous sommes concentrés sur les sites EREs trouvés dans la région promotrice de HYAL-1 tant proximal que distal jusqu'à 50 kb du site d'initiation de la transcription.

2.6 Génération de clones stables

Les cellules TOV21G ont été transfectées transitoirement avec 1 μ g du pcDNA ER α de la même façon décrite précédemment, 48h plus tard les cellules sont collectées avec de la trypsine (Invitrogene) et trois différentes concentrations de cellules soit 0.1, 0.15 et 0.2 millions sont mises en culture dans des pétris 100 mm contenant 10ml de milieu OSE complet, le pcDNA ER α contient le gène de résistance à la néomycine, 1mg/ml de G418 est donc ajouté au milieu de culture de sorte à ce que seules les cellules ayant intégrées le RE α dans leur génome vont survivre. Deux à trois semaines plus tard, des clones se forment dans les pétris, on pique ces clones qu'on transfère dans des plaques 24 puits contenant toujours un milieu OSE avec G418, une fois que les clones auront poussé, ils sont transférés dans des flasques T25 contenant un milieu OSE avec la moitié de G418 (0.5 mg/ml), on attend qu'ils soient confluent pour les collecter et tester leur expression du RE α par Western blot.

2.7 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules MCF-7 ont été cultivées dans des pétris de 100mm contenant un milieu DMEM-F12 sans phénol rouge avec un supplément de FBS décomplémenté et desteroidé, jusqu'à 90% de confluence puis traitées avec soit de l'EtOH, 10nM d'E2 (Sigma), 1 μ M de 4-OHT(Sigma) ou 1 μ M ICI-182780 (Sigma) pendant 40 min, ensuite les complexes protéines-ADN sont cross-linkés avec du formaldéhyde 1% pendant 10min, rincés 2 fois avec du PBS et le culot collecté par centrifugation 5min à 2.8K à 4°C. Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse SDS (50mM Tris pH 8.0 contenant 10mM EDTA et 1% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases PMSF(0.1 mM) et PIC (Protein Inhibitor Cocktail, Complete-mini, Roche Diagnostics Canada, Laval, QC, Canada) pendant 10min sur glace, et la chromatine soniquée 6x10 sec à puissance 35% (Branson Sonifier) pour obtenir des fragment d'environ 600-800 pb, puis centrifugée 10min à 13K à 4°C. La chromatine ainsi soluble est ensuite diluée 5x dans un tampon de dilution (16.7mM Tris pH 7.5 contenant 167mM NaCl, 1.2mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS et un cocktail inhibiteur de protéases). 10% de la solution est mis de côté en tant qu'input, le reste est incubé avec 2 μ g d'ADN de sperm du salomon avec des billes d'agarose couplées à des protéines A (ssDNA/protein A agarose, Millipore) pendant 1h à 4°C avec rotation pour bloquer les sites non spécifiques. Les complexes ADN-RE α sont immunoprecipités avec 5 μ g de l'anticorps anti RE α , (Santa Cruz Biotechnology) ou anti IgG de lapin comme control négatif (Santa Cruz Biotechnology) o/n à 4°C avec rotation, le lendemain 60 μ l de ssDNA/prot A agarose sont ajoutées pour chaque échantillon et incubées 1h à 4°C avec rotation, ensuite les billes sont collectées (Surnageant récupéré pour contrôler la taille de la chromatine sur gel d'agarose) 1min à 2.8K et lavées avec 4 tampons de lavage successifs : Low salt (16.7mM Tris pH 7.5 contenant 167mM NaCl, 1.2mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS et PIC), High salt (16.7mM Tris pH 7.5 contenant 500mM NaCl, 1.2mM EDTA, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS et un cocktail inhibiteur de protéases) LiCl (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 1% acide déoxycholate, 1% Nonidet P-40, 0.25M LiCl) et TE (10mM Tris pH 8, 1mM EDTA). Les complexes sont élués deux fois avec 250 μ l de tampon d'éluion (1% SDS, 0.1MNaHCO₃) 15 min à T° pièce et le cross-link avec le formaldéhyde

est reversé par l'ajout de 0.2M NaCl à 65°C pendant 4h suivit d'une digestion avec 50µg/ml de protéinase K dans 40mM Tris pH 6.5 et 10 mM EDTA à 45°C pendant 1h, avant de procéder à l'extraction de l'ADN au phénol/chloroforme et précipitation à l'EtOH 100% o/n à -20°C. L'ADN a été analysé par PCR en temps réel (q-PCR) en utilisant 0.33µL de l'input et 1µl des IP et des amorces spécifiques englobant les deux sites Sp1 proximaux et les EREs proximaux et distaux (Tableau 2, la dénomination des amorces Sp1 et EREs est donnée par la localisation de ces sites par rapport à celle du site d'initiation de la transcription +1; par exemple : Sp1 -60 est un site Sp1 situé 60 bp en amont du site d'initiation de la transcription). Les résultats sont analysés avec la méthode du $1/2^{\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = (Ct\ IP - Ct\ Input)\ Gène\ cible - (Ct\ IP - Ct\ Input)\ Actine$, et le programme suivant : 50°C pendant 2 minutes (Incubation), 95°C pendant 3 minutes (Dénaturation), et 50 cycles à 95°C/30 sec, 60°C/30 sec et 72°C/45 sec, suivit d'un point de fusion de 70 cycles avec une augmentation de la température de 0.5°C/cycle commençant à 60°C. Les échantillons ont été migrés sur gel d'agarose pour s'assurer de la spécificité des amorces utilisées et l'expérience faite 3 fois.

Tableau 2 Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par q-PCR.

Gènes	Amorces	Taille des produits
pS2	GGCCATCTCTCACTATGAATCACTTCTGC GGCAGGCTCTGTTTGCTTAAAGAGCG	320 pb
Sp1 -60	AACCAAGATCCCTTTGCCAG TCCAAATTCCTGACCCCAG	290 pb
Sp1 -1020	CACTAAGCACAATAGACCCAAGGCC GAGGTCATGTCTGGGTTACTACTATT	190 pb
ERE -900	TAACCCAGACATGACCTCCTGG GGCAATGTAGCAAGACCCCATC	195 pb
ERE -32350	CCAAGGCAGGTGGATCATTG TTGGCTCACTGCAACCTTTGCC	200 pb
ERE -48430	ATAAGGAGGAGGAAGAGCAGCG TGCCAATCGCCATAGTATTTGG	130 pb
ERE -50130	ACATGGAGGGGCAAATCCAG TGTGCTCACTCTGGTTCCTACTGC	135 pb
βActin	GTGGGCTCTAGGCACCA TGGCCTTAGGGTTCAGGGGG	239 pb

2.8 Les vecteurs d'expression

Les vecteurs pBlueScript et pcDNA 3.1 ont été acheté chez Stratagene (La Jolla, CA, E.U.) et Invitrogen, respectivement. Les vecteurs pBLUC et pcDNA-RE α sont des dons du Dr Tremblay (CHU Ste-Justine). Les plasmides pBLUC-F1, pBLUC-F2 ont été construit au laboratoire et sont décrit dans le clonage, le plasmide EREtk-LUC est utilisé en tant que control positif du système ERE-RE α , c'est un vecteur contenant l'ERE classique

en amont du gène rapporteur luciférase sous le control du promoteur de la thymidine kinase (Don du Dr. Tremblay, CHU Ste-Justine). Le plasmide pGL3-control (Promega, Madison, E.U.) est un vecteur dont le gène rapporteur luciférase est sous le control d'une forte région promotrice, la SV40, et donc est utilisé comme control positif de l'expérience.

2.9 Clonage Moléculaire

La séquence de la région promotrice proximale de HYAL1 (Figure 13) a été extraite à partir du GenBank accession # NG_009295 (National Center for Technology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.9.1 Amplification des inserts par PCR

Les inserts (ou promoteurs) qu'on a appelé F1 (1282pb) et F2 (746pb) ont d'abord été amplifié par PCR à partir d'un échantillon d'ADN génomique humain (THP) en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 3), la polymérase Pfx et le programme suivant : 95°C pendant 5 minutes, (95°C pendant 35 secondes, 62°C pendant 35 secondes, 68°C pour 1 minute et 40 secondes) répété 35 fois et 68°C pour 10 minutes, ensuite les inserts F1 et F2 ont été purifiés avec le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) selon les instructions du manufacturier.

Tableau 3 Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

Nom de l'amorce	Séquence 5'3'
Amorce sense F1	CCGACGGTCGACGACACAGTCACTAACCCAGC
Amorce sense F2	CCGACGGTCGACAGCACAGTGGAGCAGTCTTG
Amorce antisense R1	GGCGCGGGATCCTCCAAATTCCTGACCCCAG
Amorce antisense R2	GGCGCGGGATCCCTGAAGGGCCTTATCCTCC

2.9.2 Clonage dans le vecteur pBluescript

N'ayant pas pu cloner les deux inserts F1 et F2 directement dans le vecteur pBLUC, nous les avons d'abord cloné dans le vecteur de clonage pBluescript. Pour cela, Le vecteur pBluescripts a été digéré avec l'enzyme de restriction SmaI qui permet d'engendrer des bouts francs comme ceux obtenus après amplification de F1 et F2 par l'enzyme Pfx, ce qui permet ainsi de procéder directement à l'étape de ligation sans digérer les deux inserts, ensuite 5µl de la ligation a été transformé dans les bactéries compétentes «Library Efficiency DH5-α» d'E.coli (Invitrogene) comme suit : 30 min sur glace suivit d'un choc thermique à 42°C pendant 45 sec, le mélange est dilué dans 250µl de milieu SOC et incubé à 37°C pendant 1h 30 min, puis 100µl sont prélevés et étalés sur des pétris LB agar qui contiennent en plus de l'ampicilline, du x-gal, substrat de la β-galactosidase. Ceci nous a permis de reconnaître les colonies positives car si les produits de la PCR se sont insérés à la bonne place, le gène de la β-galactosidase ne serait plus fonctionnel et les colonies positives seraient alors blanches. Par la suite, une trace d'une colonie positive est prélevée et étalée sur une masterplate, pour ensuite prendre une colonie et l'inoculer dans 3 ml de

milieu LB o/n à 37°C avec agitation, cette miniprep est purifiée avec le kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega), et 2 µl sont digéré avec les enzymes BamHI et Sall pour s'assurer que l'insert est bien présent. Finalement 100µl de la miniprep sont prélevés et inoculés dans 100ml de milieu LB puis incubés 16h à 37°C avec agitation, le lendemain la midiprep est purifiée avec le kit Pure Yield™ Plasmid midiprep System (Promega) quantifiée par spectrophotomètre en mesurant la D.O.

2.9.3 Sous-clonage dans le vecteur pBLUC

Après avoir obtenu les deux plasmides pBluescripts F1 et F2, il ne restait plus qu'à les sous-cloner dans le vecteur pBLUC. Les mêmes étapes que lors du premier clonage ont été suivit à quelques différences près : le vecteur pBLUC est digéré avec deux enzymes de restriction (Double digestion) BamHI et Sall pendant 3h à 37°C, et les deux inserts F1 et F2 sont retirés du plasmide pBluescripts par digestion avec les mêmes enzymes BAMHI et Sall avant de procéder à la ligation avec le pBLUC en utilisant la T4 ADN ligase (NEB) à 16°C pendant 16-18h puis à 65°C pendant 10 min, viennent en fin les mêmes étapes de transformation bactérienne, miniprep et midiprep décrites précédemment.

```

501 CTGACAGCTC ATATGCATGG TCACACAAAC ACAGGATCTC ATGCTCACAA
551 GACAGCAGGG CTCACACACA CCCAGTCCCA GGCAGTGGGT TCCACACTCA
601 CACCTACTTG CCACTGGAAT TTGTGCAGAG GCTCAGATGG TCACTAAATG
651 GGGCTTCACA AAGACACAGT CACTAACCCA GCACATATAC AAAGGGTGAT amorce F1
701 GACACAGCCC TGACTTCATG AACACAGTGC CTTTCAGAAA CAGGTCCCTA
751 CAACAGGGAT GACTTATCCA CTAAGCACAA TAGACCCAAG GCCTAGGGCC
801 ACAGTACTTT CAGGGGCCCA CAAAATGTTT TTTTAATCAG AAGAAGAATA Sp1 -1020
851 TAAATGTAAA TATATTAATA ATTAATATAT AATAGTGTA CCAGACATG
901 ACCTCCTGGG CTCAAGCACT CCTCCTGCCT CAGTGTCCCA AGTAGCTGGG
951 ACTACAGGTA CATACCACCA TGCC CAGCTA ATTTTTAATT TTTTTGTAGA ERE -900
1001 GATGGGGTCT TGCTACATTG CCTAGGCTGG TCTCGAACTC CTGGGCTCAA
1051 GCAATTCTCC CACCTCAGCC TCCCAAAGTG CTAAGACTAT AGCCATATAT
1101 ATATATATAT ATATATATAT ATATATATAT ATATATTTTT TTTTTTTTTT
1151 TTTTTTTTTGA GATGGAGTCG CTCTCTGTCA CCCAGGCTGG AGTATAGTAG amorce F2
1201 CACAGTGGAG CAGTCTTGGC TCACGTCAAC CTCTGCCTCC CGGGTTCAAG
1251 GGATTGTCCT GCCTCAGCCT CCCGAGTAGC TGGGATTACA GGCGCCTGCC
1301 ACCACGCCCC GCTAATTTTT TGTATTTTTA GTAGAGAAGG GGTTTCACCA
1351 TGTTAGCCGG GATGGTCTCG ATCTCCTGAC CTCGTGATCT GCCACCTCGG
1401 CTTCCCAAAG TGCTAGGATT ATAGGCGTGA GCCTCCGCAC CTGGCATGCC
1451 TGGCCATATT TTTAAATATT TTTTTTAAGG AGGAAAAGAT CCACGAAAGT
1501 AAAGTGCCTA GGGCCCATCA ATGTCAGATG CAGCCACGTG GACAAAGAAC
1551 ACTCCCTGAG CACAAGACAC GAAAGAACCC GGTCTCCAGT GTCACAAACA
1601 GGCCTGCCCA GCAGGGTCTG CCCCTGCCCA CCTCCTCCAG CCTAGGTAAG
1651 GCCACAAAGC CCTGCCCTAG TGCTGACAGC GTGGGAGGGG CCACTGTTGG
1701 CCCAGCCCCA CCCCCAACCA AGATCCCTTT GCCAGGGATT CAGAGGTAGC
1751 CCTGATGCCT GGCTGGCCTG GCCTCCTAAT CCAAGGCCCG CCCCTTGGCC Sp1 -60
1801 CGCCCCTGGC CTGGGTGGGG TGACCCCCTA CAAAAGCTCA GAATTTCCAG
1851 CAGCGGCTC C TTCCTCCAGG AGTCTCTGGT GCAGCTGGGG TGGAATCTGG site +1
1901 CCAGGCCCTG CTTAGGCCCC CATC CTGGGG TCAGGAAATT TGGAGGATAA amorce R
1951 GGCCCTTCAG CCCC AAGGTC AGCAGGGACG AGCGGGCAGA CTGGCGGGTG
2001 TACAGAGGG CTGGGTTGAC CTGTCTTGG TCACTGAGGC CATTGGATCT
2051 TCCTCCAGTG GCTGCCAGGA TTTCTGGTGG AAGAGACAGG AAGGCCCTCC
2101 CCCCTTGGTC GGGTCAGCCT GGGGGCTGAG GGCCTGGCTG TCAGCCACTC
2151 TTCCAGAAC ATATGTCATG GCCTCAGTGG CTCATGGGGA AGCAGGGGTG
2201 GGCGAGCTTA GGCTAGAGCA AGTCCTGTGG GAGATGGCAG AGGCCTGGTC
2251 TGAGAGGCAA CTCGGATGTG CCCTCCAGTG GCCATGCTCC CCTCCATGCG
2301 TCTCCCTGC CCTCCTGGAG CCCTGCAGGT CAATGTTTAA CAGAAACCAG
2351 AGCAGCGGTG GATTAATGCG CAAGGGCTCA GCCCCCAGC CCTGAGCAGT
2401 GGGGGAATCG GAGACTTTGC AACCTGTTCT CAGCTCTGCC TCCCCTGGCC
2451 AGGTTGTCCT CGACCAGTCC CGTGCCATGG CAGCCCACCT GCTTCCCATC début
                                     M A A H L L P I protéine
2501 TGCGCCCTCT TCCTGACCTT ACTCGATATG GCCCAAGGCT TTAGGGGCC HYAL1
      C A L F L T L L D M A Q G F R G P
2551 CTTGCTACCC AACCGGCCCT TCACCACCGT CTGGAATGCA AACACCCAGT
      L L P N R P F T T V W N A N T Q W

```

Figure 13 Séquence de la région promotrice proximale de HYAL1.

Les lettres en dessous des acides nucléiques, vers la fin de la séquence correspondent aux acides aminés du début de la HYAL1. La séquence a été extraite du GenBank accession # NG_009295 (National Center for Technology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.10 Essai luciférase

Les cellules TOV21G ont été co-transfectées comme décrit précédemment avec 500ng du plasmide d'expression pBLUC-F1 ou F2 ou ERE tk-LUC ou PGL3-control plus 40ng du pcDNA ER α ou pcDNA 3.1, on traite ou non avec l'E2 pendant 16 h. Le lendemain, après deux lavage avec PBS, les cellules sont lysées avec un tampon de lyse (Cell Culture Lysis Reagent Promega) 10 min à T° pièce, collectées à l'aide d'un grattoir et centrifugées 2 min à 4°C afin d'en retirer les débris. L'activité luciférase est mesurée en mélangeant 20 μ l du lysat avec 100 μ l du réactif « Luciferase Assay Reagent ». Les mesure sont réalisées dans un luminomètre de type Luminoskan Ascent (Thermo Scientific). Les valeurs luciférases ont été normalisées pour l'efficacité de la transfection par apport aux valeurs luciférases du PGL3-control.

2.11 Analyse statistique

Les analyses biostatistiques ont été effectuées en utilisant le Test t de Student bilatéral a variance égale, les résultats sont considérés significatifs si $p < 0.05$.

3 Résultats

3.1 HYAL-1 est sous-exprimé par le RE α dans la lignée TOV21G

Des résultats précédents dans notre laboratoire ont montré que l'expression de l'ARNm de HYAL-1 était élevée dans les lignées cellulaires et chez les patientes avec CEO de type mucineux et à cellules claires, et qu'elle était inversement corrélée à celle du RE α (107). Nous avons donc voulu savoir si HYAL-1 était directement régulé par le RE α . Pour ce faire, nous avons transfecté le plasmide du RE α dans les cellules TOV21G qui dérivent du CEO à cellules claires exprimant un niveau élevé de HYAL-1 mais négative pour le RE et analysé l'expression par q-RT-PCR. La figure 14C démontre qu'en effet, en présence du RE α , on observe une diminution significative de l'expression de l'ARNm de HYAL-1 de 50%.

L'expression du RE α dans la TOV21G est évaluée par Western blot (Figure 14A) et q-RT-PCR (Figure 14B) mais son activité fonctionnelle est évaluée par l'activation de gènes cibles connus tels que le TFF1/pS2 avec une augmentation de 1.75 fois ainsi que de GREB-1 avec une augmentation de 2.55 fois (Figure 14 D et E). Dans cette expérience nous avons eu un effet du RE α même sans traitement à l'E2 parce qu'en tout temps les cellules ont été cultivées dans un milieu avec phénol rouge et FBS non-traité au dextran et charbon activé, condition qui peut agir comme un œstrogène faible et donc activer le RE α (182). Cependant, pour le reste des expériences de ce travail, les cellules ont été mises en culture dans un milieu sans phénol rouge supplémenté de FBS traité au dextran et charbon activé afin d'éliminer toute trace d'œstrogène contenue et ainsi utiliser une concentration fixe d'E2 pour mieux contrôler la réponse à l'œstrogène entre les différentes expériences.

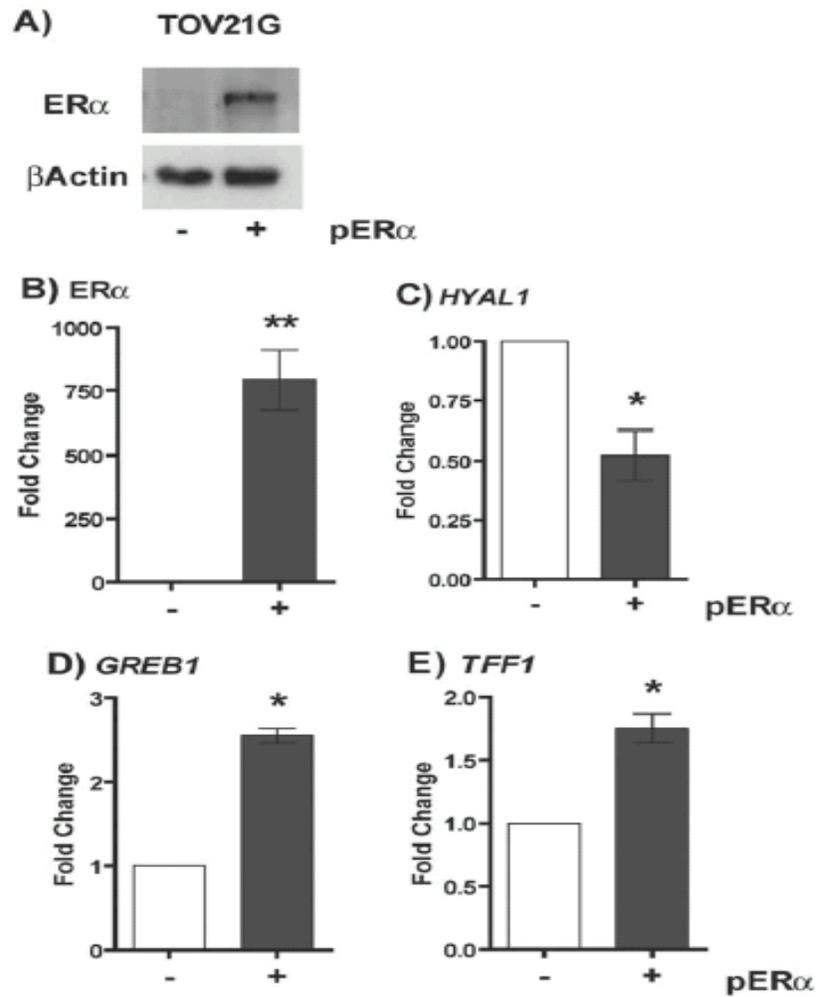


Figure 14 Régulation négative de HYAL-1 par le RE α dans la lignée TOV21G

Le pcDNA-ER α (pER α) a été transfecté transitoirement dans la lignée du CEO à cellules claires: la TOV21G, l'efficacité de la transfection du pER α a été vérifiée par Western blot (A) avec le β -actin comme contrôle et par q-RT-PCR (B), l'expression de l'ARNm de HYAL-1, TFF1 et GREB-1 a également été analysée par q-RT-PCR, (-) représente le contrôle négatif transfecté avec le pcDNA 3.1 vide et le (+) représente les cellules transfectées avec le pcDNA-ER α . Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de 3 expériences différentes. Test t de Student: * p<0.05, ** p<0.01.

3.2 Identification d'EREs sur le promoteur de HYAL-1 par Genome Wide Scan

Pour comprendre le mécanisme par lequel le RE α régule HYAL-1, on a fait une recherche d'EREs sur le promoteur de HYAL-1. ERE comme décrit dans la section 1.1.6.1.2 est cette séquence retrouvée sur le promoteur de gènes cibles et au niveau de laquelle le RE α se lie pour activer ou réprimer la transcription. L'analyse de la séquence de 1532 pb à partir du site d'initiation de la transcription du gène HYAL-1 associée à des clonages et à des essais luciférase ont permis l'identification du promoteur proximal de HYAL-1 (-93+17) (183) et ont révélé des sites consensus de liaison pour certains facteurs de transcription tels que Sp1, egr-1, AP-2 et NF κ B à travers lesquels le RE α peut probablement exercer son action par des interactions protéine-protéine (Voir section 1.1.6.1.3) (Figure 15A), mais pas d'EREs. Cependant en se basant sur de récentes analyses par genome wide scan des sites de liaison du RE α disponibles dans la banque de données CHIP on ChIP (179-181), nous avons identifié l'existence d'un certain nombre d'EREs sur le promoteur proximal de HYAL-1, un ERE à -900 pb à partir du site d'initiation de la transcription et 3 autres distaux (-32350 pb, 48430pb et -50130pb) en amont ont ainsi été découverts (Figure 15B).

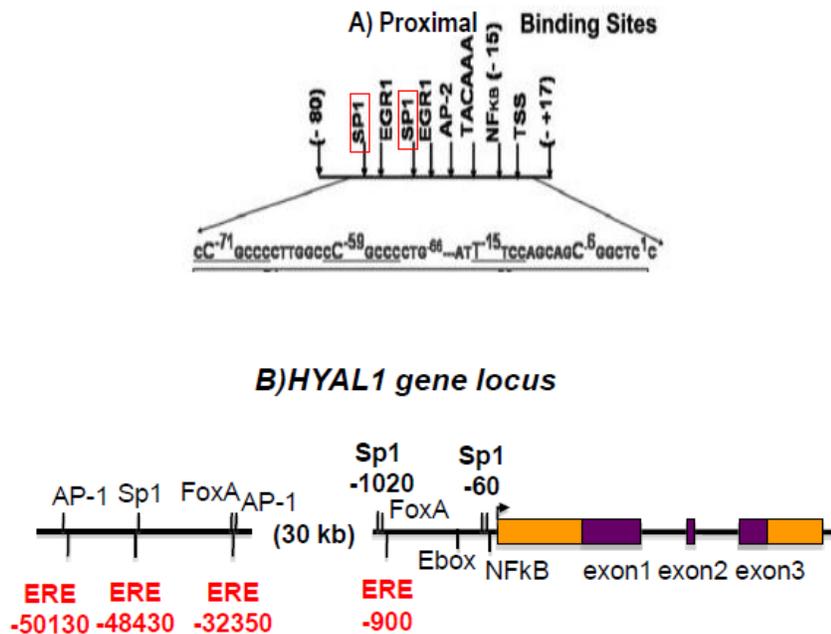


Figure 15 Promoteur de *HYAL-1*

(A): illustre le promoteur minimal de *HYAL-1* avec les sites de liaison pour certains facteurs de transcription (Extrait avec modifications à partir de la référence (183)).

(B): illustre les EREs proximaux et distaux identifiés par genome wide scan, les sites Sp1, FoxA ainsi que NFκB sont également représentés. (À partir de la banque de données CHIP on Chip pour analyser les EREs, 4 de ces éléments ont été retrouvés sur le promoteur de *HYAL-1*).

3.3 Génération de clones stables TOV21G-ERα

La transfection transitoire du pcDNA-ERα dans la lignée TOV21G (Figure 14) nous a certes permis de confirmer que *HYAL-1* était sous-exprimé par le REα, mais pour comprendre le mécanisme de cette régulation, il faut effectuer d'autres expériences comme par exemple les ChIP qui nécessitent la génération d'une lignée TOV21G exprimant de façon stable le REα. Le pcDNA-ERα contient le gène de résistance à la néomycine, de la G418 est donc ajoutée au milieu de culture pour la sélection des clones positifs car seuls

ceux ayant intégrés le pcDNA-ER α dans leur génome vont survivre. Malheureusement après 3 essais nous n'avons pas eu de clones positifs. En effet, à la première tentative, très peu de clones ont poussé en raison de la concentration élevée de G418 utilisée pour la sélection des clones positifs qui était de 1.5mg/ml, sur les 4 testés, aucun clone n'était positif. On a réessayé une deuxième fois mais en diminuant la concentration de G418 cette fois à 1mg/ml et beaucoup de clones ont poussés, plus d'une centaine ont été testés mais encore une fois aucun n'était positif. Par la suite, sachant que le RE α pouvait être dégradé par le protéasome, on a décidé de refaire l'expérience de la même façon que la précédente mais cette fois ci avant d'être testés par Western blot, les clones ont été traités avec du MG132 un inhibiteur du protéasome, sur 80 clones testés un seul était positif (Figure 16) mais après un passage le clone est mort.

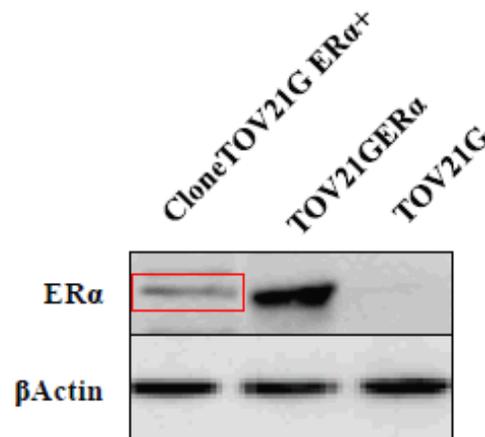


Figure 16 Expression stable du RE α dans la lignée TOV21G

Les clones positifs ont été sélectionnés avec la G418, leur expression du RE α testée par Western blot. Sont représentés : le seul clone exprimant le RE α , La TOV21G transfectée transitoirement avec le pcDNA-ER α , utilisée comme control positif, et la non transfectée en tant que control négatif.

3.4 HYAL-1 est sous-exprimé par le RE α dans la lignée MCF-7

N'ayant pas pu avoir des clones stables TOV21G exprimant le RE α , on s'est tourné vers la lignée MCF-7 du cancer du sein, qui est RE α (+), de plus le genome wide scan a lui aussi été réalisé sur cette même lignée. En premier, nous avons voulu savoir si l'expression de l'ARNm de HYAL-1 dans la lignée MCF-7 était aussi réprimée par le RE α comme ce fut le cas pour la TOV21G du CEO, les cellules MCF-7 ont donc été cette fois ci mises en culture dans un milieu sans phénol rouge et traitées pendant 16h avec soit de l'E2, du 4-OHT, qui est un agoniste partiel de L'E2 ou du ICI-182780, un antagoniste pure qui entraine la dégradation du RE α au niveau protéique, les trois étant dilués dans l'EtOH, ou bien traitées avec l'EtOH seul (control négatif). À la figure 17A, on voit que la protéine RE α est toujours exprimée dans la lignée MCF-7 suite aux traitements avec l'E2 et l'OHT mais qu'elle ne l'est plus en présence de l'ICI 182,780 qui a entraîné sa dégradation.

La figure 17B montre que lorsqu'on traite la MCF-7 avec l'E2, le niveau d'expression de l'ARNm de HYAL-1 diminue de façon significative, de moitié comme cela a été observé pour la TOV21G, puis augmente légèrement en présence du 4-OHT étant donné que c'est un agoniste partiel mais dès qu'on traite avec l'antagoniste pur l'ICI 182,780, l'expression de HYAL-1 revient presque à son niveau basal.

Comme la fois précédente, pS2 et GREB-1 ont été utilisés en tant que contrôles positifs de l'activité fonctionnelle du RE α . En effet, étant des gènes cibles du RE α , on voit que l'expression de leurs ARNm (Figure 17C et D) augmente significativement avec une induction de 3 fois pour pS2 et de 5 fois pour GREB-1 suite au traitement à l'E2 pour ensuite diminuer sous l'effet du 4-OHT et de l'ICI 182,780. On note aussi que l'ARNm de GREB 1 diminue sous le niveau basal après le traitement avec l'ICI 182,780.

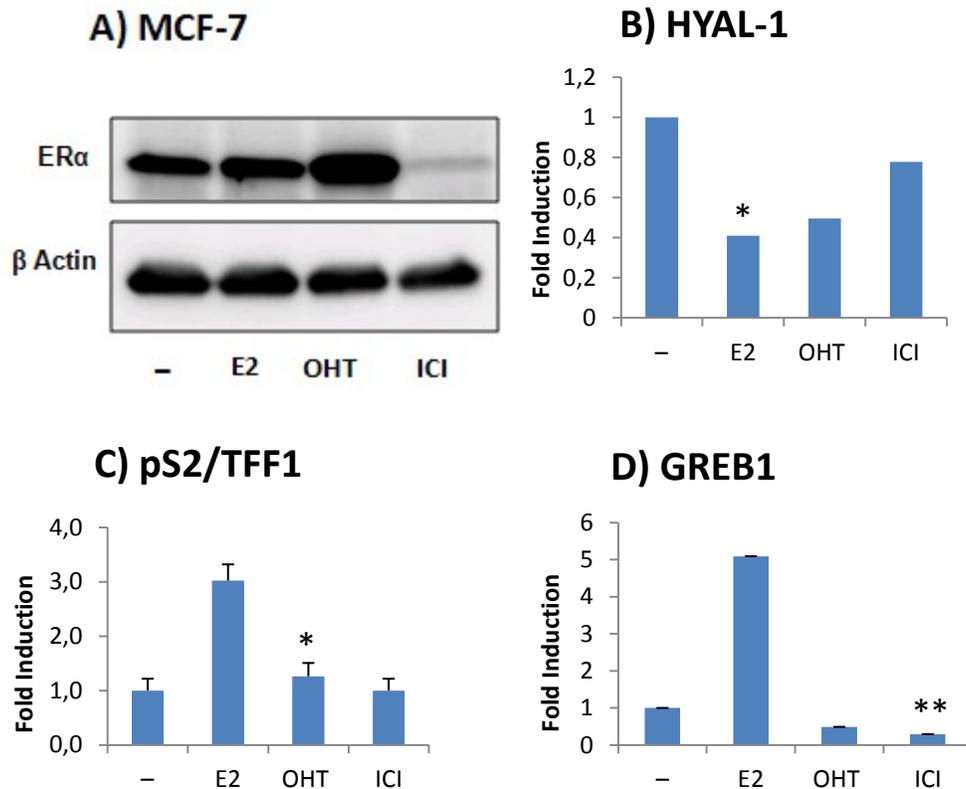


Figure 17 Régulation négative de HYAL-1 par le RE α dans la lignée MCF-7

Les cellules MCF-7 ont été traitées avec soit de l'E2, OHT, ICI 182, 780 ou laissées sans traitement. L'expression du RE α a été vérifiée par Western blot (A). L'expression de l'ARNm de HYAL-1 (B) a été évaluée par q-RT-PCR, ainsi que celle de pS2/TFF1 et GREB-1 (C, D). Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs en duplicata de 3 expériences indépendantes. Test t de Student, * p<0.05, ** p<0.01.

3.5 Implications des sites EREs et Sp1 de la région promotrice de HYAL-1 dans le recrutement du RE α .

Le but de l'expérience étant de déterminer l'occupation des sites spécifiques du promoteur de HYAL-1, EREs identifiés par genome wide scan et Sp1 identifiés par Lokeshwar et son équipe (183), par un facteur de transcription qui est le RE α en réponse aux traitements avec l'E2, le 4-OHT et l'ICI-182780 par immunoprécipitation de la

chromatine. Pour ce faire nous avons traité les cellules MCF-7 avec soit de l'EtOH, l'E2, 4-OHT ou avec l'ICI 182,780 pendant 40 min, temps requis pour atteindre un niveau maximal de liaison du RE α sur la chromatine, puis on a immunoprécipité les complexes RE α -ADN avec un anticorps dirigé contre le RE α . Le niveau d'enrichissement de l'ADN est mesuré par Real time PCR (q-PCR) en utilisant des amorces spécifiques qui englobent les EREs proximaux et distaux de la région promotrice de HYAL-1 (Figure 15). Comme décrit dans la section 1.1.6, le mécanisme d'action du RE α peut se faire via les EREs ou bien les Sp1, nous avons donc inclus des amorces pour les deux sites: Sp1 -60 et Sp1 -1020, sachant qu'un mécanisme peut prévaloir sur l'autre. Nous avons également utilisé des amorces qui englobent le promoteur de pS2 qui comme les fois précédentes nous a servi de control positif, car il est connu qu'en réponse à l'E2, le RE α est recruté au niveau de l'ERE retrouvé sur sa région promotrice. Comme attendu le niveau d'enrichissement sur le promoteur du gène pS2 après stimulation par l'E2 est d'environ 15 fois, et diminue suite aux traitements avec l'agoniste partiel 4-OHT et l'antagoniste pure l'ICI 182,780, ceci permet de s'assurer de l'efficacité des traitements effectués (Figure 18A). De plus, il n'y a pas de liaison sur ce promoteur dans les échantillons immunoprécipités avec le control négatif anti IgG (Figure 18A). En ce qui concerne le promoteur de HYAL-1, les résultats démontrent que suite à la stimulation avec l'E2, le RE α est recruté sur le promoteur de HYAL-1 au niveau du site Sp1 -1020 avec un enrichissement d'environ 10 fois mais pas au niveau du site Sp1 -60 (voir les barres d'erreurs qui croisent la ligne du control) (Figure 18B). Le RE α est aussi recruté sur le promoteur de HYAL-1 au niveau de l'ERE proximal -900 et du distal -32350 avec un enrichissement d'environ 8 et 6 fois, respectivement, et un peu moins sur l'ERE -48430 avec une différence de 3 fois par rapport aux cellules non traitées (Figure 18C). Par contre aucun recrutement significatif n'a été observé au niveau de l'ERE le plus distal -50130 pb (Figure 18C). Le résultat est confirmé par les traitements avec l'OHT et l'ICI-182780, où comme attendu, on observe une diminution de l'occupation des sites Sp1 et EREs qui répondent normalement à l'E2. Ces résultats suggèrent que le RE α régulerait HYAL-1 en se liant directement aux EREs selon le mécanisme d'action classique mais aussi indirectement en se liant au Sp-1 par des interactions protéine-

protéine, ce qui permet de potentialiser l'activité transcriptionnelle du RE α sur le promoteur de HYAL-1.

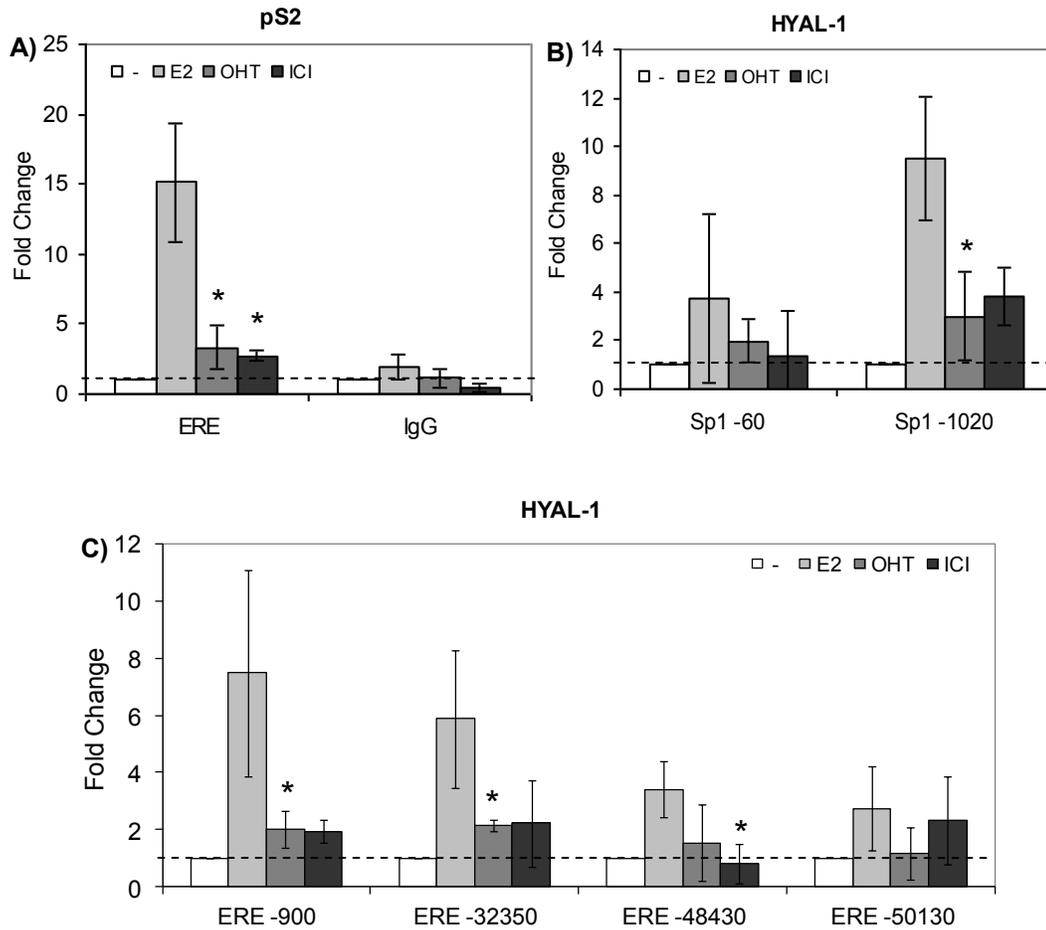


Figure 18 Recrutement du RE α aux sites Sp1 et EREs localisés sur la région proximale et distale du promoteur de HYAL-1.

Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 40 min avec de l'E2, l'OHT, l'ICI 182,780 ou laissées sans traitement. L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée avec un anticorps anti RE α ou anti IgG en tant que control négatif. Le niveau d'enrichissement de l'ADN a été quantifié par q-PCR en utilisant des amorces qui englobent l'ERE du promoteur de pS2 (A), les Sp 1 -60 et -120 (B) de même que les EREs -900, -32350, -48840 et -50130 (C) du promoteur de HYAL-1. Les barres d'erreurs représentent la différence d'enrichissement sur le promoteur de pS2 et HYAL-1 suite aux traitements avec les anti-

œstrogènes (OHT et ICI) comparé au traitement avec l'E2. Les résultats sont considérés significatif si * $p < 0.05$.

3.6 Implication biologique des sites EREs et Sp1 proximaux de la région promotrice de HYAL-1 dans la régulation transcriptionnelle du gène HYAL-1 par le RE α

Pour évaluer l'implication des éléments de liaison proximaux dans la régulation de HYAL-1 par le RE α , les essais de gènes rapporteurs à la luciférase sont un excellent outil permettant de mesurer l'activité d'un promoteur in vitro, nous avons donc d'abord généré par PCR une région de 1,5 Kb flanquant l'exon 1 du promoteur HYAL-1 et contenant l'ERE à -900 pb du site d'initiation de la transcription et les deux sites Sp1 (à -60 et -1020 pb), séquence qu'on a appelé F1 et nous l'avons cloné en amont du gène rapporteur luciférase dans le vecteur pBLUC. Une autre séquence F2 tronquée à environs 700 pb du site d'initiation de la transcription fut aussi générée (Figure 19), ne contenant pas l'ERE proximal ni le Sp1 à -1020 pb, mais contient le site Sp1 à -60 pb, nous permettant d'évaluer l'implication ou non des sites ERE et Sp1 localisés à environs 1000 pb du site d'initiation. La réussite du clonage dans le pBLUC a été confirmée par le séquençage des 2 midipreps.

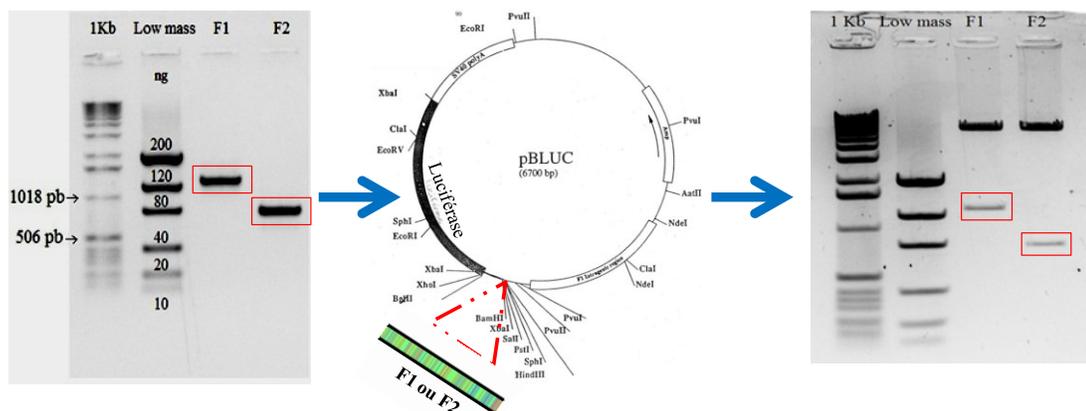


Figure 19 Construction de pBLUC-F1 et pBLUC-F2

Les deux inserts F1 et F2 encadrés en rouge ont été amplifiés par PCR, puis clonés en amont du gène rapporteur luciférase dans un vecteur pBLUC.

Une fois que les vecteurs d'expression pBLUC-F1 et F2 furent générés, il ne restait plus qu'à procéder aux essais luciférase, toujours dans les cellules TOV21G du CEO à cellules claires, nous avons effectué des co-transfections transitoires avec deux constructions à chaque fois, l'EREtK-LUC ou le pBLUC-F1 ou F2 ou PGL3-control plus le pcDNA-ER α ou pcDNA vide, traité ou non avec l'E2. Le plasmide PGL3-control a une séquence identique à celle du pBLUC sous le control du promoteur SV40, nous l'avons utilisé pour normaliser les valeurs luciférase.

Le rapporteur ERÉtk-LUC a été utilisé en tant que control positif afin de valider le système ERE-RE α car il contient un ERE classique sous le control du promoteur de la timidine kinase, donc en le co-transfectant avec le RE α on s'attend à ce que son activité augmente en réponse au ligand E2, et effectivement comme le démontre la figure 20A, l'activité luciférase augmente et ce de façon significative lorsqu'on co-transfecte le vecteur ERÉtk-LUC avec le pcDNA-ER α (1.5 fois) par rapport aux cellules transfectées avec le pcDNA3.1 vide et encore plus après traitement avec l'E2 (3.5 fois) par rapport aux cellules non traitées. Ceci prouve que le système ERE-ER α marche bien.

En ce qui concerne maintenant nos constructions pBLUC-F1 et F2, pour pBLUC-F1 nous avons observé une diminution significative de l'activité luciférase et donc de l'activité du promoteur de HYAL-1 de 50% comme cela été observé pour l'ARNm, ce qui suggère que la sous-expression de HYAL-1 par le RE α se ferait via les sites ERE et/ou Sp1 localisés dans cette région proximale du promoteur, toutefois ce résultat a été observé avec ou sans traitement avec l'E2 (Figure 20 B). Cependant, il n'y a pas de différence significative dans l'activité luciférase pour le pBLUC-F2 soit en présence ou non du RE α . Ces résultats confirment les précédents obtenus par ChIP, et donc le site proximal Sp1 -60 n'est pas impliqué dans la régulation de HYAL-1 par le RE α . En plus, nous avons aussi noté une augmentation de l'activité luciférase de pBLUC-F2 comparé à pBLUC-F1, ceci

s'explique par le fait qu'on a retiré les éléments de répression du vecteur pBLUC-F2, soit l'ERE -900 et/ou le Sp1 -1020.

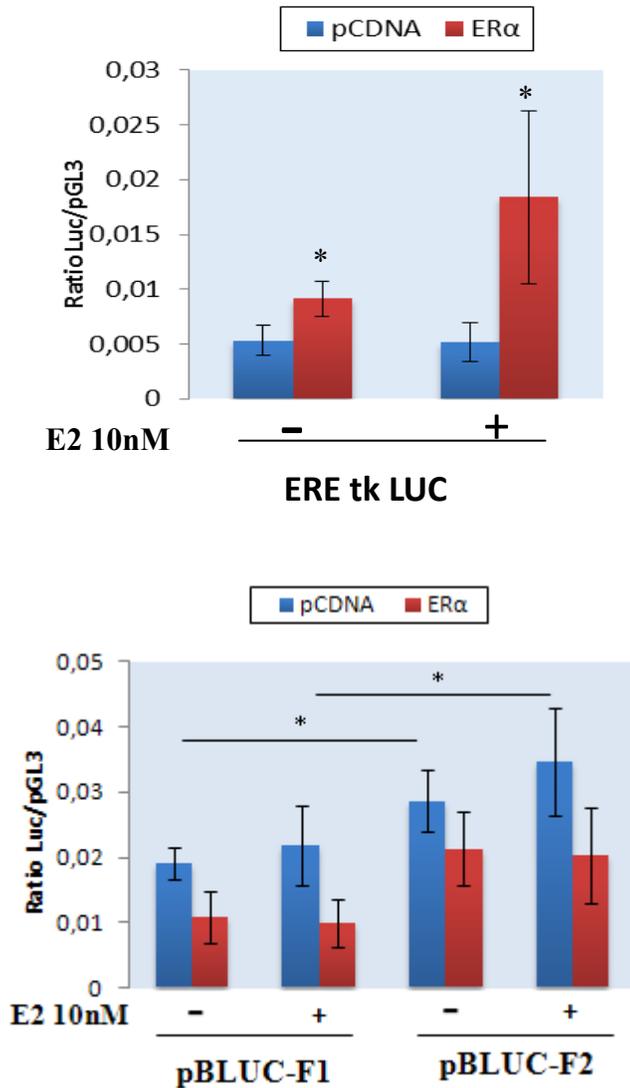


Figure 20 Répression du promoteur de HYAL-1 par le RE α via l'ERE et/ou Sp1

Les cellules TOV21G ont été co-transfectées avec 500ng du rapporteur EREtk-LUC (control positif) ou d'un fragment du promoteur de HYAL-1 soit contenant l'ERE -900 et les Sp1 -60 et -1020 (pBLUC-F1) ou bien tronqué ne contenant que le Sp1 -60 (pBLUC-F2) plus 40 ng du pcDNA-ER α ou pcDNA3.1 vide (mock), traitées (+) ou non (-) avec 10nM d'E2. Les résultats ont été normalisés pour l'efficacité de la transfection par apport aux valeurs luciférase du PGL3-control. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen des valeurs en duplicata de 5 expériences indépendantes et considéré comme significative si $p < 0.05$ (*), Test t de Student.

4 Discussion

HYAL-1 appartient à la famille des hyaluronidases mammifères connues pour leur rôle physiologique dans la dégradation de l'acide hyaluronique et aussi dans la cicatrisation des blessures et l'inflammation, mais qui a attiré l'attention plus pour son implication dans divers types de cancer. En effet HYAL-1 est surexprimé dans plusieurs cancers, notamment le cancer de la prostate la vessie, la tête, le cou et le sein où son expression corrèle avec la croissance tumorale et les métastases (155, 171-173, 177). Comme mentionné précédemment et en accord avec ces observations, notre laboratoire a aussi démontré récemment une expression élevée de HYAL-1 dans le cancer épithélial de l'ovaire de type mucineux et à cellules claires (107). Toutefois et en dépit de ce qui est connu maintenant sur HYAL-1 et son implication dans la tumorigenèse, peu d'information existe sur la régulation de l'expression de ce gène (183). Intéressant, notre laboratoire a aussi démontré que cette expression élevée de HYAL-1 est inversement corrélée à celle du RE α (107). De plus, il a été rapporté que des lignées du cancer du sein négatives pour le RE ont aussi un niveau élevé de l'HYAL-1 par rapport aux lignées RE positives (184). Le RE α est un facteur de transcription qui suite à son activation par l'hormone va réguler l'expression d'une multitude de gènes, son rôle crucial dans le cancer du sein est d'ailleurs bien établi et a été beaucoup étudié (80, 82, 85, 90, 91), en revanche peu est connu sur son implication dans le cancer de l'ovaire (102-104). De plus, parmi tous les gènes régulés par le RE α , plus de 70% sont réprimés, mais si le mécanisme de l'activation des gènes par le RE est très bien caractérisé celui de la répression reste peu connu.

Dans ce projet de recherche nous avons voulu déterminer le lien qui existe entre le RE α et HYAL-1 dans le cancer épithélial de l'ovaire à cellules claires, plus précisément nous avons voulu caractériser le mécanisme de la régulation du gène HYAL-1 par le RE α . Jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée au rôle de HYAL-1 dans le cancer de l'ovaire et encore moins à sa régulation par le RE α . Ce projet vise donc à apporter une contribution à ce niveau

Dans cette étude nous avons démontré que l'expression ectopique du RE α dans la lignée TOV21G (lignée RE α (-)) par transfection transitoire induit une diminution significative de l'expression de HYAL-1 de 50% par rapport aux cellules non transfectées (Figure 14). De même que le traitement de la lignée du cancer du sein, la MCF-7 (lignée RE α (+)) avec l'œstrogène entraîne aussi une diminution significative d'environ 50% de l'expression de HYAL-1 par rapport aux cellules non traitées (Figure 17). Ces résultats identifient donc HYAL-1 comme étant un gène cible du RE α réprimé par ce dernier. On sait que les tumeurs qui sont négatives pour le RE α sont associées à un mauvais pronostic car elles ne répondent pas aux anti-œstrogènes et sont les plus agressives à cause de leur capacité à proliférer et à envahir les tissus avoisinants. Ce processus métastatique implique la matrice extracellulaire dont le constituant principal est le HA, substrat de la HYAL-1 et dont les propriétés angiogéniques ont été décrites précédemment (Voir Sections 1.3.4 et 1.3.5). Aussi, les lignées cancéreuses du sein négatives pour le RE α secrètent une quantité élevée de HYAL-1 et sont associées à un caractère invasif avec formation de tubules (184). Ce qui nous a permis de postuler que la régulation de HYAL-1 par le RE α participerait dans la croissance et la progression du CEO à cellules claires.

L'étape suivante était de déterminer le mécanisme de cette régulation au niveau du promoteur de HYAL-1. Comme décrit précédemment le RE α peut exercer son action via différents mécanismes et l'un des mécanismes par lequel le RE α régule l'expression de ses gènes cibles est son interaction indirecte avec le promoteur via un autre facteur de transcription qui lie l'ADN. L'identification du promoteur proximal de HYAL-1 (-93+17) par Lokeshwar et son équipe a d'ailleurs révélé des sites de liaison pour certains facteurs de transcription tels que Sp1, NF κ B, egr-1 et AP1 (183). Le RE α peut aussi se lier directement avec le promoteur de ses gènes cibles au niveau d'une séquence appelée ERE, jusqu'à présent aucune séquence ERE n'a été retrouvée sur le promoteur de HYAL-1, mais récemment, une analyse par génome wide scan (179, 180) nous a permis d'identifier un ERE à -900pb à partir du site d'initiation de la transcription et 3 autres distaux à environ -30-50Kb (Figure 15). Nous avons donc voulu déterminer l'implication de ces EREs dans la régulation de HYAL-1 par le RE α , en premier par des expériences d'immunoprécipitation

de la chromatine (ChIP), nous avons aussi étudié l'implication des sites Sp1 localisés dans la région proximale du promoteur de l'HYAL-1 (à -60 et -1020bp) (Figure 15) dans la régulation de HYAL-1. Pour ces expériences, nous avons utilisé la lignée MCF-7 (RE α (+)) car nous n'avons pas réussi à générer une lignée TOV21G exprimant le RE α de façon stable. Nos résultats démontrent un enrichissement de plus de 6 fois pour la liaison du complexe RE α -E2 sur le promoteur de HYAL-1 au niveau des sites EREs à -900 et -32350 pb et aussi au niveau du site Sp1 -1020 (Figure 18), un enrichissement mineur sur l'ERE -48430 et aucun enrichissement n'a été observé ni sur l'ERE situé à -50130 pb ni sur le site Sp1 -60. Intéressant, l'activité biologique de l'ERE proximal -900 et Sp1 -1020 a ensuite été confirmé par les expériences de gène rapporteur à la luciférase (Figure 20). Nous avons montré que l'activité luciférase induite par le fragment de \sim 1500 pb du promoteur proximal de HYAL-1 (F1) était significativement diminuée par le RE α comparée aux cellules TOV21G transfectées avec le pcDNA vide. Le fragment tronqué du promoteur proximal de HYAL-1 (\sim 700 pb, F2) (ne contenant pas l'ERE -900 ni le Sp1 -1020) avait une activité luciférase significativement élevée que celle du fragment complet, indiquant que des éléments répresseurs ont été retirés (Figure 20). Ce qui est aussi intéressant, c'est que l'effet du RE α sur le fragment F1 a été observé en présence ou en absence de l'E2, indiquant possiblement un mécanisme d'action du RE α indépendant du ligand. Ce résultat concorde avec les études ayant été faites sur la liaison du RE sur l'ADN in vitro et qui suggèrent que le RE peut se fixer sur la chromatine en présence ou en absence d'œstrogène (185-189). Pour confirmer cette hypothèse, on pourrait refaire la même expérience en co-transfectant le promoteur pBLUC-F1 avec un RE α dont le LBD a été muté, de cette façon si le résultat obtenu est le même qu'avec le RE α sauvage on pourra dire que la diminution de l'activité du promoteur de HYAL-1 par le RE α est œstrogène indépendante, par contre, si c'est l'inverse qui se produit c'est-à-dire une augmentation de l'activité comme celle observé avec l'ERE seul alors le RE α seul peut diminuer l'expression du promoteur de HYAL-1.

Néanmoins, pour mieux comprendre le mécanisme par lequel le RE α régule l'expression de HYAL-1, nous avons réalisé des expériences de q-RT-PCR et de ChIP sur

les cellules MCF-7 traitées avec l'agoniste partiel tamoxifène (4-OHT) ou bien avec l'antagoniste pur (ICI 182, 780) et comparé les résultats à ceux obtenus avec les cellules traitées avec l'E2. En accord avec un mécanisme d'action du RE α sur la régulation de HYAL-1 indépendant du ligand, nous avons observé que le niveau de l'ARNm de HYAL-1 était légèrement affecté par l'OHT mais complètement inversé par l'ICI 182,780 (Figure 17). On s'attendait donc à ce que le RE α se fixe sur la région promotrice de HYAL-1 après traitement avec le 4-OHT mais pas avec l'ICI 182, 780. Cependant, la liaison du RE α au niveau des sites EREs et Sp 1 du promoteur de HYAL-1 (du moins les sites étudiés dans ce présent travail) n'a pas été observé après traitement des cellules MCF-7 aussi bien avec le 4-OHT qu'avec l'ICI 182,780 (Figure 18), ce qui pourrait indiquer un mécanisme d'action dépendant du ligand. Ces divergences pourraient être dues à une faible liaison du complexe RE α -OHT au promoteur de HYAL-1 ou bien aux différents temps de traitement utilisés au cours des différentes expériences. En fait, à part les expériences de CHIP où le temps de traitement est de 40 min, toutes les autres expériences se font après 16h. Dans notre laboratoire, l'efficacité des traitements ainsi que la fiabilité des expériences a toujours été basée sur la réponse des gènes cibles connus du RE α (pS2 et GREB1) (Voir figures 14, 17 et 18). Nos résultats avec ces gènes autant par qRT-PCR que par CHIP ont été similaires à ceux déjà rapportés dans la littérature (51, 190-193), toute fois ces gènes sont surexprimés par le RE α tandis que HYAL-1 est réprimé. Il donc est possible que différentes cinétiques de liaison du RE α et de la réponse soient nécessaires pour la répression transcriptionnelle comme ce fut le cas pour le promoteur du gène Slug où le RE α et le corépresseur NCor sont recrutés à différent temps après stimulation avec l'E2 (194).

Comme cela a été bien exposé tout au long de ce mémoire, suite à sa stimulation par l'hormone, le RE α va se lier sur le promoteur de gènes cibles au niveau d'une séquence appelée ERE et initier toute une cascade d'événements dont le résultat final sera l'expression ou la répression du gène cible. Ces événements incluent le recrutement des corégulateurs, coactivateurs incluant ceux qui vont remodeler la chromatine et modifier les histones pour rendre l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle de base ainsi que ceux qui sont directement impliqués dans l'activation de la transcription du RE α . D'autres

corégulateurs tels que le NCoR et le SMRT sont des corépresseurs connus pour être recrutés suivant un traitement avec un agoniste partiel de l'E2 tel que le tamoxifène et leurs rôles dans des conditions normales de stimulation avec l'E2 n'est pas encore clair. La plupart des études ayant été faites sur la régulation de l'expression de gènes par le RE α portent sur des gènes surexprimés par le RE tels que TFF1/pS2 ou bien GREB-1 (Growth regulation by estrogen in breast cancer) (195-199). Aujourd'hui, les avancées technologiques récentes ont permis d'analyser le génome humain en entier et ont pu cartographier les sites de liaison du RE α suite au traitement avec l'E2 par immunoprecipitation de chromatine couplée à des microarray (ChIP on CHIP) ou couplée avec des séquençages à haut débit (ChIP-seq). Ces études ont révélé que sur plus de 400 gènes régulés par le RE α , 70% sont en fait réprimés (179-181, 200, 201). Le mécanisme de cette répression estrogène-dépendante n'est pas encore tout à fait connu et les quelques études ayant été faites suggèrent que pour les gènes dont la down-régulation se produit tôt après la stimulation par l'E2, la répression serait due à la séquestration de facteurs en dehors de ces gènes, phénomène connu aussi sous le nom de squelching physiologique, alors que la répression se produisant relativement tard après la stimulation avec l'E2 impliquerait le recrutement de corépresseurs capables d'inhiber la transcription tels que les corépresseurs NCoR, SMRT ainsi que Les HDACs, entraînant la condensation de la chromatine la rendant inaccessible à la machinerie transcriptionnelle d'où l'absence de l'ARN polymérase II. Il y a aussi le corépresseur NRIP1 (Nuclear receptor interacting factor 1) impliqué dans la répression de gènes adjacents aux sites AP-1. Le gène de la cycline G2 qui code pour des régulateurs négatifs du cycle cellulaire (202), les cadhérines E, important médiateur des interactions cellule-cellule (203), ou encore le gène KISS1, qui code pour les kisspeptines, ligand du récepteurs couplés au protéines G (204), PROS1 (205), Slug qui fait partie de la voie de signalisation des E-Cadherin-Snail-Slug-EMT (epidermal-mesenchymal transition) autre voie impliquée dans la progression des tumeurs mammaires (194), sont quelques gènes parmi tant d'autres connus pour être réprimé par le RE α .

5 Perspectives et conclusion

Nos résultats suggèrent que le RE α est recruté sur le promoteur de HYAL-1 où il réprime son expression. La régulation de l'expression de gènes est un processus complexe impliquant plusieurs facteurs, le RE α ne peut pas à lui tout seul activer ou réprimer un gène. Cette capacité qu'il a d'initier ou de réprimer la transcription de ses gènes cibles dépend de son interaction avec des corégulateurs: coactivateurs et corépresseurs qui ont été décrits dans la section 1.1.6.3. La prochaine étape consistera donc à déterminer si la répression de HYAL-1 par le RE α est le résultat du recrutement de corépresseurs et ce par des expériences de CHIP, comme nous l'avons fait avec le RE α . Plusieurs corépresseurs ont été décrits dans la littérature entre autre, le NCoR, SMRT et le LCoR. On s'attend à observer un recrutement d'un de ces corépresseurs après stimulation avec l'E2, et qui à leurs tours recrutent des HDACs. Toujours par CHIP on pourrait aussi vérifier la présence ou non de l'ARN Pol II, le recrutement d'HDAC signifie que la chromatine est dans un état condensé et compacte et donc le promoteur inaccessible à la machinerie transcriptionnelle d'où l'absence de l'ARN Pol II. Comme cela a été mentionné dans la discussion, il serait nécessaire d'effectuer des expériences sur la cinétique de liaison du RE α et de ces corépresseurs sur la chromatine afin de déterminer le meilleurs temps permettant la détection de corépresseurs sur le promoteur de HYAL-1.

Ces expériences de CHIP ont été faites sur la lignés MCF-7, sachant que notre but était la régulation de HYAL-1 dans le CEO, il va falloir trouver une lignée ovarienne qui exprime le RE α ou bien réessayer à nouveau un système de clone stable inductible à la tétracycline ou encore essayer le système de lentivirus.

Pour déterminer le rôle indépendant de chaque site Sp1 -1020 et ERE -900 dans la régulation de l'HYAL-1 par le RE α , nous allons faire des expériences de mutagénèse dirigées contre ces sites et/ou une double mutation. L'activité de ces mutants sera ensuite déterminée par des essais luciférase.

Dans un tout autre contexte, nous proposons d'investiguer le rôle de HYAL-1 dans la croissance et la prolifération des tumeurs à cellules claires. Comme mentionné précédemment le rôle de HYAL-1 dans la croissance tumorale et les métastases dans différents types de cancers tels que le cancer de la prostate, de la vessie, des reins et du sein est bien établi (voir section 1.3.5) (160, 171, 173, 176, 206). Dans ces études, il a été démontré que l'inhibition de HYAL-1 dans ces types cancéreux induit une diminution de régulateurs du cycle cellulaire tels que les cyclines B1, cdc25c, cdc2/p34 entraînant l'arrêt du cycle cellulaire. Nous allons donc inhiber l'expression de HYAL-1 dans la lignée TOV21G avec des sh-RNA dirigé contre ce gène puis évaluer l'impact de cette inhibition sur la prolifération cellulaire par des tests MTT, des analyses du cycle cellulaire (cytométrie en flux, marquage à l'iodure de propidium). De même que l'effet sur la croissance tumorale et l'invasion, pour ce faire les clones qui n'expriment pas HYAL-1 seront comparés pour leur habilité à former des agrégats, (Croissance sphéroïde) et à migrer sur une surface rayée (test d'invasion).

En résumé, nos résultats démontrent que l'HYAL-1 est un gène cible du RE α . Le RE α est recruté sur les sites EREs et Sp1 retrouvés sur le promoteur de HYAL-1 où il entraîne sa répression. Cette étude identifie donc HYAL-1 comme gène cible du récepteur RE α dans les tissus reproducteurs et suggère un mécanisme pour la répression transcriptionnelle de HYAL-1 par les œstrogènes. Avec leur rôle respectif dans la croissance cellulaire et dans la tumorigenèse, l'identification de la voie de régulation RE α /HYAL-1 devient une avenue d'investigation importante dans les pathologies hormono-dépendantes.

6 Bibliographie

1. Jacobson HI, Gupta GN, Fernandez C, Hennix S, Jensen EV. Determination of tritium in biological material. *Arch Biochem Biophys*. 1960 Jan;86:89-93.
2. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966 Jun;55(6):1574-81.
3. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec;82(23):7889-93.
4. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 1986 Mar 7;231(4742):1150-4.
5. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925-30.
6. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996 Aug 19;392(1):49-53.
7. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*. 1997 Mar;11(3):353-65.
8. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006;27(4):299-402.
9. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ER α gene promoter region. *Mol Endocrinol*. 2001 Dec;15(12):2057-63.
10. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005 Nov 4;336(4):1023-7.
11. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev*. 2004 Dec;25(6):869-98.
12. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, et al. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer research*. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 1999 Nov 1;59(21):5425-8.
13. Thomas C, Gustafsson J-Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(8):597-608.
14. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):941-51.

15. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999 May;64(5):310-9.
16. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*. 2003 Jan;17(1):1-10.
17. Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res*. 1993 Mar 11;21(5):1125-32.
18. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Oct;21(10):381-8.
19. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*. 1996 Feb;3(2):206.
20. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):753-8.
21. Leitman DC, Paruthiyil S, Vivar OI, Saunier EF, Herber CB, Cohen I, et al. Regulation of specific target genes and biological responses by estrogen receptor subtype agonists. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Dec;10(6):629-36.
22. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001 Oct;81(4):1535-65.
23. Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Oct 3;93(19):1449-57.
24. O'Regan RM, Jordan VC. Tamoxifen to raloxifene and beyond. *Semin Oncol*. 2001 Jun;28(3):260-73.
25. Nettles KW, Greene GL. Ligand Control of Coregulator Recruitment to Nuclear Receptors. *Annual Review of Physiology*. 2005;67(1):309-33.
26. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:315-60.
27. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 1998 Dec 23;95(7):927-37.
28. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*. 1997 Jun;11(6):657-66.
29. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004 Mar;90 Suppl 1:S2-6.

30. Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, et al. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995 May 17;87(10):746-50.
31. Wardley AM. Fulvestrant: a review of its development, pre-clinical and clinical data. *Int J Clin Pract.* 2002 May;56(4):305-9.
32. Dauvois S, Danielian PS, White R, Parker MG. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 1;89(9):4037-41.
33. Ali S, Buluwela L, Coombes RC. Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases. *Annu Rev Med.* 2011 Feb 18;62:217-32.
34. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997 Mar;138(3):863-70.
35. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 2000 Feb;24(1):145-55.
36. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;85(12):4835-40.
37. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Nov 30;74(5):287-96.
38. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 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.* 1993 Dec 1;90(23):11162-6.
39. Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology.* 1998 Dec;139(12):5070-81.
40. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 26;96(22):12887-92.
41. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science.* 1999 Dec 17;286(5448):2328-31.
42. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:385-409.
43. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation.* 1997 Jan 7;95(1):252-64.

44. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res*. 2002 Mar 8;90(4):413-9.
45. O'Malley BW. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. *Mol Endocrinol*. 2005 Jun;19(6):1402-11.
46. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 1997 Jun;18(3):306-60.
47. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol*. 2004 Oct;33(2):387-410.
48. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol*. 1997 Dec;19(3):207-26.
49. Seiler-Tuyns A, Walker P, Martinez E, Merillat AM, Givel F, Wahli W. Identification of estrogen-responsive DNA sequences by transient expression experiments in a human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res*. 1986 Nov 25;14(22):8755-70.
50. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 1986 Sep 26;46(7):1053-61.
51. Berry M, Nunez AM, Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1218-22.
52. Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudalet C, Parker M, Rochefort H. Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol*. 1994 Jun;8(6):693-703.
53. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jul 15;29(14):2905-19.
54. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 1999 Jun;20(3):321-44.
55. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705.
56. Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):403-10.
57. Naar AM, Lemon BD, Tjian R. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:475-501.
58. Zwart W, Theodorou V, Kok M, Canisius S, Linn S, Carroll JS. Oestrogen receptor-co-factor-chromatin specificity in the transcriptional regulation of breast cancer. *EMBO J*. 2011 Oct 14.

59. Xu J, O'Malley BW. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2002 Sep;3(3):185-92.
60. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*. 2005 Dec;5(6):343-57.
61. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jul;6(7):542-54.
62. Chen D, Huang SM, Stallcup MR. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem*. 2000 Dec 29;275(52):40810-6.
63. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000 May;65(5):227-51.
64. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):454-7.
65. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):397-404.
66. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000 Nov 30;74(5):311-7.
67. Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*. 2009 Dec;16(4):1073-89.
68. Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hihi AK, Wahli W. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem*. 1997 Jul 18;272(29):18250-60.
69. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2008 Nov;41(5):263-75.
70. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev*. 2008 Nov;28(6):954-74.
71. Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, et al. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12626-30.
72. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995 Dec 1;270(5241):1491-4.

73. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007 Jul;87(3):905-31.
74. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000 Sep 28;407(6803):538-41.
75. Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene.* 2004 Oct 18;23(48):7979-89.
76. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 12;99(23):14783-8.
77. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2005 Oct;16(8):347-53.
78. Nawaz SSaZ. *Molecular Biology of Estrogen Receptor Action.* Elsevier Inc. 2009:35.
79. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):561-70.
80. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006 Jan 19;354(3):270-82.
81. Stierer M, Rosen H, Weber R, Hanak H, Spona J, Tuchler H. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors. *Ann Surg.* 1993 Jul;218(1):13-21.
82. Willey SC, Cocilovo C. Screening and follow-up of the patient at high risk for breast cancer. *Obstet Gynecol.* 2007 Dec;110(6):1404-16.
83. Mourits MJ, GH DEB. Exogenous steroids for menopausal symptoms and breast/endometrial cancer risk. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16 Suppl 2:494-6.
84. Fernandez E, Gallus S, Bosetti C, Franceschi S, Negri E, La Vecchia C. Hormone replacement therapy and cancer risk: a systematic analysis from a network of case-control studies. *Int J Cancer.* 2003 Jun 20;105(3):408-12.
85. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Dec;102(1-5):89-96.
86. Meng YG, Han WD, Zhao YL, Huang K, Si YL, Wu ZQ, et al. Induction of the LRP16 gene by estrogen promotes the invasive growth of Ishikawa human endometrial cancer cells through the downregulation of E-cadherin. *Cell Res.* 2007 Oct;17(10):869-80.

87. Lin Z, Reierstad S, Huang CC, Bulun SE. Novel estrogen receptor-alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer Res.* 2007 May 15;67(10):5017-24.
88. Tsai EM, Wang SC, Lee JN, Hung MC. Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001 Dec 1;61(23):8390-2.
89. GeorgeThomas B. ON THE TREATMENT OF INOPERABLE CASES OF CARCINOMA OF THE MAMMA: SUGGESTIONS FOR A NEW METHOD OF TREATMENT, WITH ILLUSTRATIVE CASES.1. *The Lancet.* 1896;148(3802):104-7.
90. Jensen EV, Block GE, Smith S, Kyser K, DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1971 Dec;34:55-70.
91. Jensen EV. Estrogen receptors in hormone-dependent breast cancers. *Cancer Res.* 1975 Nov;35(11 Pt. 2):3362-4.
92. Clarke R, Liu MC, Bouker KB, Gu Z, Lee RY, Zhu Y, et al. Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7316-39.
93. Girault I, Bieche I, Lidereau R. Role of estrogen receptor alpha transcriptional coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer. *Maturitas.* 2006 Jul 20;54(4):342-51.
94. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer.* 2004 Dec;11(4):643-58.
95. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev.* 2001 Mar;53(1):25-71.
96. Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD, et al. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Apr-Jun;69(1-6):45-50.
97. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 22;95(26):15677-82.
98. Nakajima Y, Akaogi K, Suzuki T, Osakabe A, Yamaguchi C, Sunahara N, et al. Estrogen regulates tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factors ERbeta and KLF5. *Sci Signal.* 2011;4(168):ra22.
99. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nat Rev Cancer.* 2007 Sep;7(9):713-22.
100. Ho SM. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Oct 7;1:73.
101. Morch LS, Lokkegaard E, Andreasen AH, Kruger-Kjaer S, Lidegaard O. Hormone therapy and ovarian cancer. *JAMA.* 2009 Jul 15;302(3):298-305.

102. Lacey JV, Jr., Mink PJ, Lubin JH, Sherman ME, Troisi R, Hartge P, et al. Menopausal hormone replacement therapy and risk of ovarian cancer. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):334-41.
103. Burges A, Bruning A, Dannenmann C, Blankenstein T, Jeschke U, Shabani N, et al. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in human serous carcinomas of the ovary. *Arch Gynecol Obstet*. 2010 Mar;281(3):511-7.
104. Masood S, Heitmann J, Nuss RC, Benrubi GI. Clinical correlation of hormone receptor status in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1989 Jul;34(1):57-60.
105. Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*. 2008 Jan;111(1):144-51.
106. Soslow RA. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Apr;27(2):161-74.
107. Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, Tremblay A, Provencher DM, Mes-Masson AM, et al. Subtype specific elevated expression of hyaluronidase-1 (HYAL-1) in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2011;6(6):e20705.
108. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
109. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*. 2001 Feb;38(2):87-95.
110. Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol*. 2005 Feb;18 Suppl 2:S19-32.
111. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol*. 2000 Jan;19(1):7-15.
112. Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect*. 1987 Aug;73:15-25.
113. Cho KR, Shih Ie M. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:287-313.
114. Kobel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008 Dec 2;5(12):e232.
115. Wu R, Hendrix-Lucas N, Kuick R, Zhai Y, Schwartz DR, Akyol A, et al. Mouse model of human ovarian endometrioid adenocarcinoma based on somatic defects in the Wnt/beta-catenin and PI3K/Pten signaling pathways. *Cancer Cell*. 2007 Apr;11(4):321-33.
116. Cho KR. Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Nov;133(11):1775-81.
117. McCluggage WG. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*. 2011 Aug;43(5):420-32.

118. Singer G, Stohr R, Cope L, Dehari R, Hartmann A, Cao DF, et al. Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis: a mutational analysis with immunohistochemical correlation. *Am J Surg Pathol.* 2005 Feb;29(2):218-24.
119. Mayr D, Hirschmann A, Lohrs U, Diebold J. KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol.* 2006 Dec;103(3):883-7.
120. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T, et al. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc.* 2003 Mar;36(1):9-17.
121. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am J Pathol.* 1991 Oct;139(4):777-85.
122. Schwartz DR, Kardia SL, Shedden KA, Kuick R, Michailidis G, Taylor JM, et al. Gene expression in ovarian cancer reflects both morphology and biological behavior, distinguishing clear cell from other poor-prognosis ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2002 Aug 15;62(16):4722-9.
123. Tsuchiya A, Sakamoto M, Yasuda J, Chuma M, Ohta T, Ohki M, et al. Expression profiling in ovarian clear cell carcinoma: identification of hepatocyte nuclear factor-1 beta as a molecular marker and a possible molecular target for therapy of ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2003 Dec;163(6):2503-12.
124. Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2009 May;174(5):1597-601.
125. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, Chandramouli GV, Awtrey CS, Gardner GJ, et al. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Sep 15;11(18):6422-30.
126. Gemignani ML, Schlaerth AC, Bogomolny F, Barakat RR, Lin O, Soslow R, et al. Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90(2):378-81.
127. Meyer K, Rapport MM. Hyaluronidases. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1952;13:199-236.
128. Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 1995 Sep;4(9):1666-9.
129. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007 May 1;80(21):1921-43.
130. Csoka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics.* 1999 Sep 15;60(3):356-61.

131. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 2001 Dec;20(8):499-508.
132. Stern R, Jedrzejewski MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.* 2006 Mar;106(3):818-39.
133. Frost GI, Csoka AB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochemical and biophysical research communications.* 1997 Jul 9;236(1):10-5.
134. Afify AM, Stern M, Guntenhoner M, Stern R. Purification and characterization of human serum hyaluronidase. *Arch Biochem Biophys.* 1993 Sep;305(2):434-41.
135. Csoka AB, Frost GI, Wong T, Stern R. Purification and microsequencing of hyaluronidase isozymes from human urine. *FEBS Lett.* 1997 Nov 17;417(3):307-10.
136. Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry.* 2007 Jun 12;46(23):6911-20.
137. Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, et al. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med.* 1996 Oct 3;335(14):1029-33.
138. Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 May 25;96(11):6296-300.
139. Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ, Farley J, Mort JS, Byers S, et al. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2008 Jul 1;17(13):1904-15.
140. Dumaresq-Doiron K, Edjekouane L, Orimoto AM, Yoffou PH, Gushulak L, Triggs-Raine B, et al. Hyal-1 but not Hyal-3 deficiency has an impact on ovarian folliculogenesis and female fertility by altering the follistatin/activin/smad3 pathway and the apoptotic process. *J Cell Physiol.* 2011 Jul 5.
141. Lepperdinger G, Mullegger J, Kreil G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol.* 2001 Dec;20(8):509-14.
142. Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4443-8.
143. Miller AD. Hyaluronidase 2 and its intriguing role as a cell-entry receptor for oncogenic sheep retroviruses. *Semin Cancer Biol.* 2008 Aug;18(4):296-301.
144. Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, et al. Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol.* 2008 Oct;27(8):653-60.

145. Nicoll SB, Barak O, Csoka AB, Bhatnagar RS, Stern R. Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Apr 12;292(4):819-25.
146. Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod*. 1996 Jul;55(1):80-6.
147. Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol*. 2001 Dec;20(8):515-25.
148. Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod*. 1997 Feb;56(2):320-7.
149. Zhang H, Shertok S, Miller K, Taylor L, Martin-Deleon PA. Sperm dysfunction in the Rb(6.16)- and Rb(6.15)-bearing mice revisited: involvement of Hyalp1 and Hyal5. *Mol Reprod Dev*. 2005 Nov;72(3):404-10.
150. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*. 2002 Oct;54(4):195-9.
151. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jul;4(7):528-39.
152. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997 Jul;242(1):27-33.
153. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2001 Apr;12(2):79-87.
154. Stern R. Association between cancer and "acid mucopolysaccharides": an old concept comes of age, finally. *Semin Cancer Biol*. 2008 Aug;18(4):238-43.
155. Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P, Lokeshwar VB. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1;106(3):438-45.
156. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 2008 Aug;18(4):251-9.
157. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat*. 2008 Jun;11(3):110-21.
158. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J*. 2011 May;278(9):1429-43.
159. Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res*. 2002;107:305-29.

160. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem*. 2001 Apr 13;276(15):11922-32.
161. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol*. 2000 Jan;163(1):348-56.
162. West DC, Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp*. 1989;143:187-201; discussion -7, 81-5.
163. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 1985 Jun 14;228(4705):1324-6.
164. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, et al. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J Biol Chem*. 2005 Jun 24;280(25):24195-204.
165. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res*. 1997 Feb 15;57(4):773-7.
166. Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res*. 2000 Nov 1;60(21):6116-33.
167. Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, et al. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene*. 2004 Jul 29;23(34):5719-28.
168. Csoka AB, Frost GI, Heng HH, Scherer SW, Mohapatra G, Stern R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics*. 1998 Feb 15;48(1):63-70.
169. Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Yla-Herttuala S, Heinonen S, Kuronen A, et al. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer*. 2004 Mar 20;109(2):247-52.
170. Nykopp TK, Rilla K, Sironen R, Tammi MI, Tammi RH, Hamalainen K, et al. Expression of hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in serous ovarian carcinomas: inverse correlation between HYAL1 and hyaluronan content. *BMC Cancer*. 2009;9:143.
171. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, et al. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer*. 2011 Mar 15;128(6):1303-15.

172. Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P, Freger P. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res.* 2002 Jul-Aug;22(4):2423-7.
173. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2005 Mar 15;65(6):2243-50.
174. Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, Kramer M, Gomez P, Soloway MS, et al. HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer. *Cancer Res.* 2006 Dec 1;66(23):11219-27.
175. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, Knapp J, Garcia A, Hennenlotter J, et al. HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur Urol.* 2010 Jan;57(1):86-93.
176. Tan JX, Ren GS, Tu G, Li XT, Wang XY, Ran L. [Effect of silencing of hyaluronidase gene HYAL1 by RNA interference on proliferation of human breast cancer cells]. *Ai Zheng.* 2006 Jul;25(7):844-8.
177. Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, et al. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(7):e22836.
178. Ren B, Robert F, Wyrick JJ, Aparicio O, Jennings EG, Simon I, et al. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science.* 2000 Dec 22;290(5500):2306-9.
179. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature Genetics.* 2006;38(11):1289-97.
180. Kwon YS, Garcia-Bassets I, Hutt KR, Cheng CS, Jin M, Liu D, et al. Sensitive ChIP-DSL technology reveals an extensive estrogen receptor alpha-binding program on human gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 20;104(12):4852-7.
181. Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, et al. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* 2007 Jun;3(6):e87.
182. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2496-500.
183. Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, et al. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):29215-27.
184. Wang XY, Tan JX, Vasse M, Delpech B, Ren GS. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation promotion in ER (-) and ER (+) breast cancer cell lines in vitro. *Chin Med J (Engl).* 2009 Jun 5;122(11):1300-4.
185. Murdoch FE, Meier DA, Furlow JD, Grunwald KA, Gorski J. Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent upon estradiol. *Biochemistry.* 1990 Sep 11;29(36):8377-85.

186. Furlow JD, Murdoch FE, Gorski J. High affinity binding of the estrogen receptor to a DNA response element does not require homodimer formation or estrogen. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12519-25.
187. Kraus WL, Kadonaga JT. p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev.* 1998 Feb 1;12(3):331-42.
188. Cheskis BJ, Karathanasis S, Lyttle CR. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J Biol Chem.* 1997 Apr 25;272(17):11384-91.
189. Metzger D, Berry M, Ali S, Chambon P. Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol.* 1995 May;9(5):579-91.
190. Weaver CA, Springer PA, Katzenellenbogen BS. Regulation of pS2 gene expression by affinity labeling and reversibly binding estrogens and antiestrogens: comparison of effects on the native gene and on pS2-chloramphenicol acetyltransferase fusion genes transfected into MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 1988 Oct;2(10):936-45.
191. Rae JM, Johnson MD, Scheys JO, Cordero KE, Larios JM, Lippman ME. GREB 1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 Jul;92(2):141-9.
192. Sun JM, Spencer VA, Li L, Yu Chen H, Yu J, Davie JR. Estrogen regulation of trefoil factor 1 expression by estrogen receptor alpha and Sp proteins. *Exp Cell Res.* 2005 Jan 1;302(1):96-107.
193. Ghosh MG, Thompson DA, Weigel RJ. PDZK1 and GREB1 are estrogen-regulated genes expressed in hormone-responsive breast cancer. *Cancer Res.* 2000 Nov 15;60(22):6367-75.
194. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Yearsley K, Gao JX, Barsky SH. ERalpha suppresses slug expression directly by transcriptional repression. *Biochem J.* 2008 Dec 1;416(2):179-87.
195. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol.* 2004 Aug;18(8):1859-75.
196. Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Feb 15;64(4):1522-33.
197. Watanabe H, Suzuki A, Mizutani T, Khono S, Lubahn DB, Handa H, et al. Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by oestrogen. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 2002 May;7(5):497-507.
198. Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, et al. Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res.* 2000 Nov 1;60(21):5977-83.

199. Brown AM, Jeltsch JM, Roberts M, Chambon P. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Oct;81(20):6344-8.
200. Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, et al. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell*. 2005 Jul 15;122(1):33-43.
201. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology*. 2003 Oct;144(10):4562-74.
202. Stossi F, Likhite VS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem*. 2006 Jun 16;281(24):16272-8.
203. Oesterreich S, Deng W, Jiang S, Cui X, Ivanova M, Schiff R, et al. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003 Sep 1;63(17):5203-8.
204. Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, et al. Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4821-8.
205. Suzuki A, Sanda N, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, et al. Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ERalpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J Biol Chem*. 2010 Apr 30;285(18):13444-53.
206. Lokeshwar VB, Selzer MG. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol*. 2008 Aug;18(4):281-7.