

Université de Montréal

Effets de la surexpression de l'oncogène ErbB2 sur la fonction du récepteur des  
estrogènes dans une lignée d'un carcinome mammaire humain

par

David Ferland McCollough

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

11605294  
v.55

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

décembre 2004

(c) David Ferland McCollough, 2004



w  
4  
U58  
2005  
v.055

Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effets de la surexpression de l'oncogène ErbB2 sur la fonction du récepteur des  
estrogènes dans une lignée d'un carcinome mammaire humain

Présenté par  
David Ferland McCollough

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur:	Dr. Gerardo Ferbeyre
Directrice de recherche:	Dr. Sylvie Mader
Co-directeur de recherche:	Dr. Moulay Alaoui-Jamali
Membre du jury:	Dr. Edward Bradley

## RÉSUMÉ

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué au Canada. Le cancer du sein est causé par la prolifération incontrôlée de cellules épithéliales mammaires. La croissance de ces tumeurs est stimulée par les hormones stéroïdiennes estrogènes. Les effets des estrogènes sont médiés par le récepteur des estrogènes (ER). Le tamoxifène est un antagoniste partiel du ER et est utilisé fréquemment comme traitement post-opératoire et préventif du cancer du sein. 50% des tumeurs mammaires développeront une résistance aux effets anti-prolifératifs du tamoxifène.

Le récepteur de facteurs de croissance épithéliaux ErbB2 est surexprimé dans 25 à 30% des tumeurs mammaires et est associé à la résistance au tamoxifène.

Cette étude se concentre sur les effets de la surexpression de ErbB2 sur la fonction du ER. Nous étudions le patron de prolifération cellulaire de carcinomes mammaires MCF-7 surexprimant ErbB2 en présence d'estrogènes, de tamoxifène ou de l'antiestrogène total faslodex<sup>™</sup>. Nous nous concentrons aussi sur l'effet de la surexpression de ErbB2 sur l'expression des gènes cibles du ER; pS2, le récepteur de la progestérone et cMyc sous le contrôle transcriptionnel de différents types d'éléments de réponse aux estrogènes et par quelles voies intracellulaires ces effets sont médiés.

Nous montrons que la surexpression de ErbB2 confère un avantage prolifératif aux cellules de carcinomes mammaires humains et qu'elle permet l'activation de la transcription des gènes pS2 et cMyc et inhibe l'expression du récepteur de la progestérone. Nous démontrons aussi que l'effet de ErbB2 sur la transcription est dépendant des voies Raf/Erk et PI 3-kinase.

**Mots clés:** ErbB2, Récepteur des estrogènes, Résistance aux antiestrogènes, Résistance au tamoxifène, Indépendance aux estrogènes, Cancer du sein, MCF-7, Ras.

## ABSTRACT

Breast cancer is the most diagnosed cancer in Canada. Breast cancer is caused by an uncontrolled proliferation of epithelial breast cells. Estrogenic steroid hormones stimulate the growth of these tumors. The effects of estrogens are mediated through the estrogen receptor. Tamoxifen is a partial antagonist of the ER and is commonly used in the post-operative and preventive treatment of breast cancer. 50% of all breast cancer will eventually develop a resistance to the anti-proliferative effects of tamoxifen. The overexpression of the epithelial growth factor ErbB2 is overexpressed in 25 to 30% of breast tumors and is associated with tamoxifen resistance.

This study is focused on the effects of the overexpression of ErbB2 on ER function. We study the proliferation pattern of MCF-7 breast carcinoma cells overexpressing ErbB2 in the presence of estrogens, tamoxifen and the total anti estrogen faslodex<sup>™</sup>. We also focus on the effects of ErbB2 on the expression of the ER target genes pS2, progesterone receptor and cMyc under the transcriptional control of different estrogen response elements and which signal transduction pathways mediate these effects.

We show that overexpression of ErbB2 gives proliferative advantages to human breast carcinoma cells and permit an increase in the transcription of the pS2 and cMyc genes while inhibiting the expression of the progesterone receptor. We also demonstrate that the effects of ErbB2 on transcription are dependant on the Raf/Erk and PI 3-K signal transduction pathways.

**Key words:** ErbB2, Estrogen receptor, Antiestrogen resistance, Tamoxifen resistance, Estrogen independance, Breast cancer, Ras.

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>INDEX DES TABLES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>Chapitre I: INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1-Cancer du sein.....	2
2-Hormones estrogéniques.....	2
3-Récepteur des estrogènes.....	2
4-Récepteurs nucléaires.....	3
4.1-Régions et domaines des récepteurs nucléaires.....	3
4.1.1-Domaine de liaison à l'ADN.....	4
4.1.2-Région A/B.....	6
4.1.3-Domaine de liaison au ligand.....	6
5-Coactivateurs transcriptionnels.....	7
5.1-La famille des p160.....	7
5.1.1-structure et fonction de la famille des p160.....	8
5.1.2- Modulation de l'activité es membres de la famille des p160.....	9
5.1.2.1-La phosphorylation des p160 augmente leur activité transcriptionnelle.....	9
5.1.2.2-L'acétylation des p160 inhibe leur activité transcriptionnelle.....	10
5.2-Le motif LXXLL.....	10
5.3-Rôle des cointégrateurs p300/CBP dans la fonction transcriptionnelle des facteurs de transcription.....	10
5.3.1-Rôle des cointégrateurs p300/CBP dans la fonction transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.....	11
5.4-Recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base: Rôle du complexe DRIP/TRAP/ACR/Mediator.....	11
5.5-Corépresseurs transcriptionnels.....	12
6-Mécanismes d'initiation de la transcription par la machinerie transcriptionnelle générale.....	13
7-Structure et fonction du récepteur des estrogènes alpha.....	14
7.1-Domaine AF-2 et activation ligand-dépendante du récepteur des estrogènes alpha.....	14
7.2-Domaine AF-1 et activation indépendante du ligand du récepteur des estrogènes alpha.....	14
7.2.1-L'activité indépendante du ligand de ER $\alpha$ est régulée par la phosphorylation du domaine AF-1.....	15
7.2.1.1-Phosphorylation du ER $\alpha$ dépendante de la liaison au ligand.....	15
7.2.1.2-Phosphorylation du ER $\alpha$ par diverses kinases indépendamment de la liaison au ligand.....	16
7.2.2-Coactivateurs de la fonction transcriptionnelle du domaine AF-1 du ER $\alpha$ .....	17
7.2.2.1-Coactivateurs de la fonction AF-1 de ER $\alpha$ dépendants de la phosphorylation: SRA et p68/p72.....	17

7.2.2.2-Coactivateurs de la fonction AF-1 de ER $\alpha$ indépendants de la phosphorylation: Famille des p160.....	18
7.3-Éléments de réponse aux estrogènes.....	19
7.3.1-Le éléments de réponse classiques.....	19
7.3.2-Éléments de réponse aux estrogènes non-classiques.....	19
7.3.2.1-Éléments de réponse composite: Séquences riches en GC et rôle de SP1 .....	20
7.3.2.2-Éléments de réponse non classique: Éléments de réponse au TPA et rôle du facteur de transcription AP-1 .....	21
7.3.2.2.1-Régulation de l'activité de AP1 .....	21
7.3.2.2.1.1-Régulation de l'activité transcriptionnelle de c-Fos .....	22
7.3.2.2.1.2-Régulation de l'activité transcriptionnelle de c-Jun.....	23
7.3.2.2.2-Collaboration entre les facteurs de transcription ER $\alpha$ et AP-1 .....	23
7.4-Actions non-génomiques du récepteur des estrogènes alpha .....	24
8-Modulation de la fonction du récepteur des estrogènes lors du traitement du cancer du sein.....	25
8.1- Antagonistes du récepteur des estrogènes: SERMs .....	26
8.1.2-Mécanisme d'inactivation du ER $\alpha$ par les SERMs .....	27
8.1.2.1-Le tamoxifène et le traitement du cancer du sein.....	27
8.1.2.1.1-Propriétés agonistes du tamoxifène.....	28
8.1.2.1.2-Résistance au tamoxifène.....	29
8.2-Antagonistes du récepteur des estrogènes: Antiestrogènes totaux .....	30
8.2.1-Mécanismes d'inactivation du ER $\alpha$ par les antiestrogènes totaux .....	31
8.3-Inhibiteurs de l'aromatase .....	31
9-Récepteurs de facteurs de croissance et résistance aux antiestrogènes .....	32
9.1-Rôle potentiel de ErbB2 dans la résistance au tamoxifène .....	32
9.1.1-La famille des ErbB .....	32
9.1.2-Structure des membres de la famille des ErbB .....	33
9.1.3-Activation des membres de la famille des ErbB .....	34
9.1.3.1-ErbB2 est un récepteur orphelin agissant comme co-récepteur des ErbB2.....	35
9.2-Influence de ErbB2 sur l'activité du récepteur des estrogènes alpha.....	36
10-Voies des MAP kinases .....	37
10.1-Voie des MAP kinases: Raf/Erk .....	38
10.1.1- Activation de la voie des MAP kinases par les récepteurs de facteurs de croissance .....	38
10.1.2-Rôle de la voie Raf/Erk MAPkinase dans la prolifération cellulaire .....	39
10.2-Voie des MAP kinases: JNK.....	41
10.3-Voie des MAP kinases: p38.....	42
11-Voie de la PI 3-kinase .....	41
11.1-Activation de la voie de la PI 3-kinase.....	42



11.2-Modulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire par Akt .....	43
11.2.1-Modulation de l'apoptose par Akt .....	43
11.2.2-Modulation de la prolifération cellulaire par Akt.....	43
<b>Chapitre II: OBJECTIFS.....</b>	<b>45</b>
<b>Chapitre III: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>48</b>
1-Culture cellulaire.....	49
1.1-Génération des lignées AP2 et ErbB2.....	49
1.2.1-Cellules MCF-7.....	49
1.2.2-Cellules ErbB2 et AP2.....	49
1.2.3-Cellules RasV12 et pBabe.....	50
1.2.4-Cellules HEK 293 .....	50
1.3-Transfection des cellules.....	50
1.4-Essais de prolifération cellulaire par dosage protéines .....	51
2-Essais luciférase.....	52
2.1-Transfection .....	52
2.2-Extraction et réaction enzymatique.....	53
3-Essais Chloramphénicol Acétyl-Transférase (CAT).....	53
3.1-Transfection .....	53
3.2-Extraction et réaction enzymatique.....	53
4-Essais $\beta$ Galactosidase .....	53
5-Immunobuvardage de type Western Blot.....	53
5.1-Extraction des protéines.....	54
5.2-Électrophorèse des protéines.....	54
5.3-Transfert des protéines sur membranes.....	54
5.4-Immunobuvardage de type western blot .....	55
6-PCR en temps réel de banques d'ADNc .....	56
6.1-Traitement de cellules pour expériences de PCR en temps réel.....	56
6.2-Extraction de l'ARN .....	56
6.3-Réaction de transcriptase reverse.....	56
6.4-PCR en temps réel.....	57
6.4.1-Amorces .....	57
6.4.2-Mélange réactionnel.....	57
6.4.3-Cycles de PCR et lecture de la fluorescence .....	57
<b>Chapitre IV: RÉSULTATS.....</b>	<b>59</b>
1-Influence positive de la surexpression de l'ADNc de ErbB2 sur la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents éléments de réponse aux estrogènes .....	60

1.1-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel ERE <sub>3</sub> -TATA de manière dépendante au ER $\alpha$ .....	60
1.2-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT sous le contrôle d'un promoteur artificiel AP1 <sub>6</sub> -EBV de manière indépendante au ER $\alpha$ .....	62
1.3-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT sous le contrôle d'un promoteur artificiel AP1 <sub>6</sub> -EBV en présence du récepteur des estrogènes alpha.....	62
2-Génération d'une population de cellules surexprimant l'oncogène ErbB2.....	66
3-Characterisation des protéines clés des lignées cellulaires ErbB2 et RasV12.....	70
4-Avantages prolifératifs des lignées MCF-7 surexprimant ErbB2 et RasV12 sur les lignées contrôles..	74
4.1-La surexpression de ErbB2 confère un avantage prolifératif aux cellules MCF-7.....	74
4.2-RasV12 confère un avantage prolifératif aux cellules MCF-7.....	75
5-Transcription de gènes cibles du ER in vivo.....	79
5.1-L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage est régulé de manière positive par les estrogènes et de manière négative par les antiestrogènes.....	80
5.2-La surexpression de ErbB2 influence l'expression des gènes cibles de ER de manière spécifique du gène.....	84
5.2.1-ErbB2 et RasV12 augmentent de manière générale la transcription du gène pS2.....	84
5.2.2-La surexpression de ErbB2 et de RasV12 augmentent la transcription de cMyc sous le contrôle transcriptionnel d'un site AP-1.....	85
5.2.3- ErbB2 et RasV12 ont un effet négatif sur la transcription du gène PR.....	87
6-Détermination des voies de signalisations responsables des effets de la surexpression de ErbB2 et RasV12 sur la transcription des gènes cibles du ER.....	92
6.1-Influences différentes de l'inhibiteur de Mek U0126 sur la transcription de gènes cibles du ER dans les MCF-7.....	92
6.2-L'effet de ErbB2 sur les gènes cibles du ER est effectué en partie, mais pas complètement par la voie Ras/Raf/Erk.....	96
6.2.1-La voie Ras/Raf/Erk n'est pas nécessaire à l'effet positif de ErbB2 sur la transcription du gène pS2 sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE imparfait.....	96
6.2.2-L'inhibition de Mek diminue faiblement l'effet de RasV12 sur la transcription du gène pS2.....	96
6.2.3-La voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk est essentielle pour l'activation de la transcription de cMyc par la surexpression de ErbB2.....	97
6.2.4-ErbB2et RasV12 inhibent la transcription du gène PR en activant la voie des MAP kinases.....	98
<b>Chapitre V: DISCUSSION.....</b>	<b>103</b>
1-Validation du modèle de surexpression de ErbB2 dans les carcinomes mammaires humains.....	104
1.2-Validation de l'influence de ErbB2 sur la croissance cellulaire.....	104
1.3-Validation de l'influence de ErbB2 sur l'expression génique dépendante du récepteur des estrogènes..	105

2-Effets de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression génétique de cellules de carcinomes mammaires MCF-7 .....	106
2.1-Mécanismes d'action des effets dépendants du ER $\alpha$ de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression de gènes cibles: Rôle de AF-1 .....	107
2.2- Mécanismes d'action des effets indépendants du ER $\alpha$ de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression de gènes cibles .....	109
2.2.1-Mécanismes indépendants du ER $\alpha$ : Rôle potentiel de AP-1 .....	109
2.2.1.1-Mécanismes indépendants du ER $\alpha$ : Rôle potentiel de cMyc .....	111
2.3-Mécanismes d'atténuation de l'effet inducteur de l'estradiol sur la transcription et la prolifération.....	111
2.3.1-Mécanismes d'atténuation des effets inducteurs de l'estradiol: Rôle de AF-1.....	112
2.3.2-Mécanismes d'atténuation des effets inducteurs de l'estradiol: Rôle des voies non-génomiques du ER $\alpha$ .....	113
3-Surexpression de ErbB2 et résistance au tamoxifène.....	114
4-Rôle de ErbB2 dans le phénomène de résistance aux antiestrogènes totaux et aux inhibiteurs d'aromatase.....	114
4.1-ErbB2 et mécanisme de résistance aux inhibiteurs d'aromatase .....	115
4.2-ErbB2 et résistance aux antiestrogènes totaux .....	116
5-Influence négative de ErbB2 et RasV12 sur la transcription du gène PR .....	116
5.1- Implications cliniques de l'inhibition de l'expression de PR par ErbB2 et RasV12.....	117
6-Rôles de la voie Ras/Raf/Erk MAP kinase dans la modulation de l'activité du récepteur des estrogènes par ErbB2.....	118
7- Conclusion .....	119
<b>Chapitre VI: RÉFÉRENCES.....</b>	<b>122</b>
<b>Annexe I.....</b>	<b>135</b>

## LISTE DES TABLES

<b>Table 1 :</b>	Gènes cibles du ER étudiés.....	80
------------------	---------------------------------	----

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1 :</b>	Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires.....	4
<b>Figure 2 :</b>	Domaine de Liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.....	5
<b>Figure 3 :</b>	L'activation de AF-1 dépend de la phosphorylation de 4 sérines dans la région A/B phosphorylées par différentes kinases .....	16
<b>Figure 4 :</b>	Structure moléculaire d'agonistes et antagonistes du récepteur des estrogènes .....	26
<b>Figure 5 :</b>	Structure des membres de la famille des Her/ErbB .....	33
<b>Figure 6 :</b>	Membres de la famille des Her/ErbB.....	35
<b>Figure 7 :</b>	Cascade d'activation des voies MAP kinases.....	38
<b>Figure 8 :</b>	Voie des MAPkinases Raf/Erk .....	41
<b>Figure 9 :</b>	Voie de la PI 3-kinase .....	44
<b>Figure 10 :</b>	Influence positive de la surexpression du cDNA de ErbB2 sur la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents éléments de réponse aux estrogènes .....	65
<b>Figure 11 :</b>	Sélection d'une population de cellules surexprimant l'oncogène ErbB2 par FACS .....	69
<b>Figure 12 :</b>	Caractérisation des protéines clés des lignées cellulaires ErbB2 et RasV12 .....	73
<b>Figure 13 :</b>	Avantage prolifératif des lignées cellulaires surexprimant ErbB2 et RasV12 .....	78
<b>Figure 14 :</b>	L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage est régulé de manière positive par les estrogènes et de manière négative par les antiestrogènes .....	83
<b>Figure 15 :</b>	La surexpression de ErbB2 influence l'expression des gènes cibles de ER de manière gène spécifique.....	89
<b>Figure 16 :</b>	La surexpression de la forme activée de Ras (RasV12) influence l'expression des gènes cibles de ER de manière gène spécifique différemment de ErbB2 .....	91

- Figure 17 :** L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage peut être modulée par l'activation de Mek.....95
- Figure 18 :** Les effets transcriptionnels de ErbB2 sur les gènes cibles du ER nécessitent en parti l'activité de la kinase Mek.....100
- Figure 19 :** RasV12 module la transcription des gènes cibles du ER au travers la kinase Mek.....102
- Figure 20 :** Influence positive de la surexpression du cDNA de ErbB2 sur la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de 3 ERE.....137

## LISTE DES SIGLES ET ABBRÉVIATIONS

A	Alanine
AT	Antiœstrogènes total
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	Fonction d'activation 1
AF-2	Fonction d'activation 2
AIB1	Amplified in breast cancer 1
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activating protein 1
AR	Récepteur des androgènes
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C	Cystéine
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CAT	Chloramphénicol acétyl-transferase
CBP	CREB binding protein
CDK	Cyclin dependent kinase
CRE	cAMP response element
C-terminal	Carboxy-terminal
DBD	Domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain)
E2	17- $\beta$ -œstradiol
EGF	Facteur de croissance épithélial (epithelial growth factor)
EGFR	Récepteur de EGF
ER	Récepteur des œstrogènes
ER $\alpha$	Récepteur des œstrogènes alpha
ER $\beta$	Récepteur des œstrogènes beta
ER+	Tumeur/cellule exprimant le récepteur des œstrogènes
ER-	Tumeur/cellule exprimant pas le récepteur des œstrogènes
ERE	Élément de réponse aux œstrogènes

Erk	Extracellular regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
GF	Facteur de croissance (Growth factor)
GFP	Green fluorescent protein
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GRIP-1	Glucocorticoid receptor interacting protein
HAT	Histone actéyl transferase
HEG0	Récepteur des estrogènes alpha
HEK 293	Human epithelial kidney cells
HER	Human EGF receptor
IA	Inhibiteurs d'aromatase
ICI	ICI 182,780
JNK	Jun N-terminal kinase
KDa	Kilo Dalton
LBD	Domaine de liaison du ligand
LUC	Luciferase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MAP	Mitogen activated protein
MCF-7	Cellules de carcinomes mammaires humains ER+
NCoR	Nuclear receptro corepressor
NID	Domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires
NR	Récepteurs nucléaires
N-Terminal	Amino-terminal
P	Proline
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidylinositol kinase
PI 3-kinase	Phosphatidylinositol kinase



PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3, 4,5-triphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PR	Récepteur de la progestérone
PTB	Phosphotyrosine binding domain
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque <i>all trans</i>
RSK	S6 ribosomal subunit kinase
S	Sérine
Ser	Sérine
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SH2	src homology domain 2
SH3	src homology domain 3
SMRT	Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SRA	Steroid RNA activator
SRE	Serum response element
SRC-1	Steroid receptor coactivator 1
SRC-2	Steroid receptor coactivator 2
TAF	TBP associated factors
Tam	Tamoxifène
TBP	TATA binding protein
TFII	Transcription factor II
TIF-2	Transcription intermediary factor 2
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TR	Récepteur de l'hormone thyroïdienne
U0126	Inhibiteur de Mek
Zn	Zinc

## REMERCIEMENTS

Je voudrais premièrement remercier Dr Sylvie Mader de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait profiter de ses connaissances, de son expérience et de sa grande rigueur scientifique. Je la remercie aussi de m'avoir laissé une grande latitude dans mon projet de recherche qui m'a permis de développer mes aptitudes d'adaptation, d'organisation d'indépendance et de rigueur.

Je remercie également le Dr Moulay Alaoui-Jamali pour son aide technique et matériel ainsi que le Dr Gerardo Ferbeyre et Frédéric Antoine-Malette pour m'avoir fourni les cellules MCF-7-RasV12.

Je tien aussi à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé dans le laboratoire pour m'avoir fourni soutien technique et moral pour la durée entière de ma maîtrise.

Je désire remercier spécialement mes parents qui ont toujours cru et eu confiance en moi et en mon potentiel, surtout dans les moments où je ne possédais plus cette foi ni cette confiance.

Trent Reznor, Liam Howlett, Chester Bennington et Jonathan Davis pour la trame sonore de ces deux dernières années

Et finalement mademoiselle Amélie Garneau: La plus grande chercheuse ne faisant pas de recherche que je connaisse. Merci pour ton aide dans les moments difficiles, pour ta vision pragmatique de la recherche et pour ton sourire.

## Chapitre I: INTRODUCTION

## **1-Cancer du sein**

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué au Canada. Une femme canadienne sur neuf développera un cancer du sein au cours de sa vie et une femme atteinte sur vingt-sept en périra [National Institute of Canada : Cancer Statistics 2004, [www.cancer.ca](http://www.cancer.ca)]. Le cancer du sein est caractérisé par la prolifération incontrôlée de cellules épithéliales mammaires. Le cancer du sein est une pathologie hétérogène au niveau de la morphologie des tumeurs, de leur potentiel métastatique et du pronostic de survie.

## **2-Hormones estrogéniques**

La prolifération des cellules mammaires est régulée par les estrogènes. Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes produites en plus grande partie dans les ovaires. Les estrogènes exercent d'importants rôles régulateurs dans les systèmes reproducteurs mâles et femelles ainsi que dans le développement et la différenciation de la glande mammaire (Klinge 2000). De plus, ces hormones sexuelles sont aussi connues pour avoir un rôle dans des pathologies comme l'ostéoporose et le développement de cancers dans les organes reproducteurs femelles. Particulièrement, la plupart des tumeurs mammaires dépendent des estrogènes pour leur croissance (Dickson, McManaway et al. 1986; Lippman, Huff et al. 1986).

## **3-Récepteurs des estrogènes**

L'effet des estrogènes dans l'organisme est médié par un type de protéine nommé récepteur des estrogènes (ER). Il existe deux types de récepteur des estrogènes, le récepteur des estrogènes alpha ( $ER\alpha$ ) et le récepteur des estrogènes beta ( $ER\beta$ ). Ces deux récepteurs sont les produits de gènes différents agissant comme facteurs de transcription et comme médiateur de voies de signalisation. Le  $ER\alpha$  est retrouvé en quantité prédominante dans l'utérus et les glandes mammaires ainsi que dans certains tissus osseux tandis que  $ER\beta$  est plutôt retrouvé dans le système nerveux central, les systèmes cardiovasculaire et immunitaire, les tissus osseux, ainsi que le système urogénital. Les phénotypes des souris knockout des 2 récepteurs sont différents, ce qui implique que les 2 récepteurs des estrogènes ne sont pas impliqués dans les mêmes

fonctions physiologiques. Les souris knockout pour le ER $\alpha$  sont infertiles (mâles et femelles), ont des niveaux élevés d'estrogènes et de stéroïdes, une densité osseuse réduite et un développement réduit de l'utérus (femelle), de la prostate (mâle) et des glandes mammaires (Korach, Couse et al. 1996; Hewitt and Korach 2003). Les souris knockout pour ER $\beta$  se développent de manière normale mais le nombre d'oocytes arrivant à ovulation est diminué chez la femelle (Hewitt and Korach 2003). L'expression du ER $\alpha$  est indispensable pour la stimulation de la croissance des cellules mammaires et utérines: La croissance dépendante des estrogènes des tissus mammaires et utérins des souris knockout pour ER $\alpha$  est abolit. Il est à noter que le ER $\alpha$  est présente dans 6 à 10% des cellules épithéliales normales tandisque 60% des tumeurs mammaires au stade primaire expriment le récepteur (Jacquemier, Hassoun et al. 1990). L'expression du ER $\beta$  ne semble par contre pas avoir de corrélation avec les tumeurs mammaires. (Hanstein, Djahansouzi et al. 2004). Par contre, l'expression de ER $\beta$  dans certaines lignées cellulaires semblent avoir un effet antagoniste sur l'activité du ER $\alpha$  (Kushner, Agard et al. 2000).

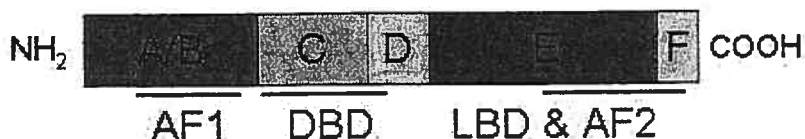
#### **4-Récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription médiant la traduction de l'action de petites molécules lipophiles telle que les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes en action transcriptionnelle. Ces petites molécules lipophiles ont la propriété de traverser la membrane plasmique et d'accéder au noyau de la cellule. Une fois dans le noyau, ces hormones vont lier leur récepteur spécifique, causant une homo- ou hétérodimérisation des récepteurs nucléaires, suivie d'une liaison de séquences spécifiques sur l'ADN composées de 2 demi-sites (1 par récepteur) arrangés de manière particulière. Après liaison à l'ADN, les récepteurs peuvent influencer la transcription de gènes cibles à proximité du site de liaison.

##### **4.1-Régions et domaines des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires possèdent 6 régions d'homologie ayant différents degrés de conservation de séquence entre les membres de la superfamille: La régions N-terminale variable A/B, la région C hautement conservée, la région charnière D, la

région conservée E et la région F. Ces différentes régions composent 3 principaux domaines fonctionnels autonomes pouvant être interchangeés entre membres de la superfamille sans perte de fonction. Ces domaines sont: Le domaine d'activation AF-1 dans la région A/B pouvant fonctionner de manière autonome, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) composé de la région C et le domaine de liaison au ligand (LBD) formé par les régions E et F incluant la fonction d'activation de la transcription ligand-dépendante AF-2. Les ligands se liant à la région E/F de tous les récepteurs nucléaires n'ont pas encore tous identifiés. Les récepteurs dont les ligands n'ont pas été caractérisés sont appelés récepteurs orphelins. Un schéma explicatif de ces domaines est présenté dans la figure 1.



**Fig.1. Domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires**

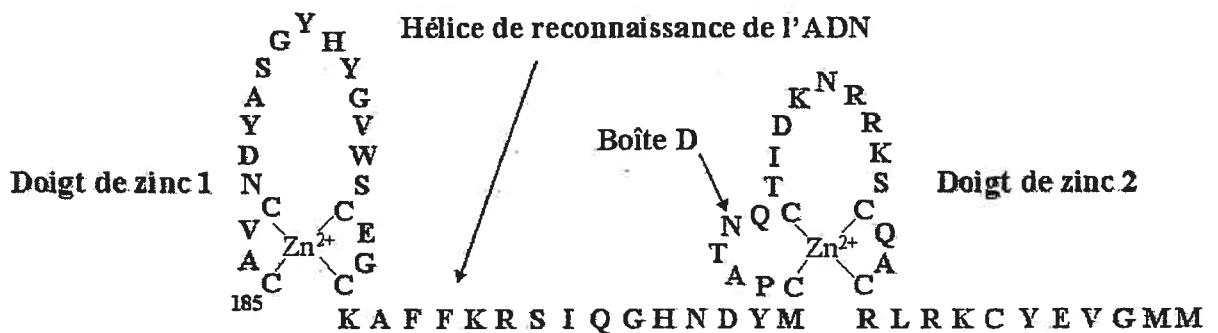
Les récepteurs nucléaires sont généralement compris d'une région N-terminale peu conservée contenant la fonction d'activation 1 (AF-1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) hautement conservé, une région charnière (D) et une région C-terminale comprenant le domaine de liaison au ligand et le domaine d'activation de la transcription 2 (AF-2) (Darimont, Wagner et al. 1998; Aranda and Pascual 2001; Khorasanizadeh and Rastinejad 2001).

#### 4.1.1-Domaine de liaison à l'ADN

Le DBD est composé de la très conservée région C et d'une partie de la région D. En effet, la délétion de la région D inhibe la capacité de dimérisation et de liaison à l'ADN du récepteur des estrogènes alpha (Mader, Chambon et al. 1993). Le DBD contient deux hélices alpha et deux motifs de type doigt de zinc qui, selon les données de cristallographie à rayons X, forment un sous-domaine fonctionnel essentiel à la liaison d'éléments spécifiques sur l'ADN (Schwabe, Chapman et al. 1993).

L'hélice située en carboxy-terminal du premier doigt de zinc est l'hélice de reconnaissance de l'ADN qui forme des contacts spécifiques avec des bases dans le sillon majeur de l'ADN (Edwards 2000). La mutation des cystéines du doigt de zinc N-terminal empêche la liaison à l'ADN et la transcription de gènes cibles (Green and

Chambon 1987) tandis que les mutations des cystéines du deuxième motif à doigt de zinc (C-terminal) empêchent la dimérisation des récepteurs et la liaison à l'ADN (Green, Kumar et al. 1988). Trois acides aminés dans la boucle du premier motif à doigt de zinc formant la boîte P (Boîte P) confèrent la spécificité des récepteurs nucléaires à certaines séquences d'ADN (Sanchez, Nguyen et al. 2002). La Boîte D, formée par la deuxième boucle du motif à doigt de zinc, permet la dimérisation des récepteurs nucléaires. Ce type de dimérisation permet la stabilisation du complexe ADN-récepteur et oriente le dimère de récepteurs de manière appropriée pour la liaison aux éléments de réponse (Freedman 1992; Zilliacus, Wright et al. 1995). Cette dimérisation confère aux récepteurs nucléaires la capacité de lier deux séquences identiques répétées. L'organisation de ces demi-éléments répétés est de 2 types: Une répétition de demi-éléments directs/en tandem séparés par 1-5 nucléotides ou des répétitions palindromiques (inversées) de demi-éléments séparés par 1 ou 3 nucléotides. Par exemple, les hétérodimères RAR/RXR vont lier spécifiquement des séquences PuGG/TTCA (spécificité conférée par la Boîte P) répétées deux fois, de même orientation et séparés par 2 ou 5 nucléotides (spécificité conférée par la Boîte D) . Le récepteur des glucocorticoïdes va quant à lui former des homodimères et lier des séquences palindromiques PuGAACA séparées par 3 nucléotides.



**Fig. 2. Domaine de Liaison à l'ADN des récepteurs nucléaires.**

Le DBD des NR est composé de 2 motifs à doigt de zinc reconnaissant l'ADN avec 2 degrés de spécificité. La Boîte P donne une spécificité au NR pour certaines séquences sur l'ADN tandis que la Boîte D et autres surfaces d'interaction permet la dimérisation des NR sur l'ADN.

#### 4.1.2-Région A/B

La région A/B est la région la moins conservé entre les récepteurs nucléaires. Cette région comprend le domaine d'activation de la transcription 1 (AF-1). Ce domaine peut permettre l'activation du récepteur nucléaire en l'absence de ligand. Cette fonction est promoteur- et tissu-spécifique, c'est à dire qu'elle est régulée de manière différente selon les conditions et les gènes cibles. La fonction d'activation 1 peut être régulée par différentes kinases. La phosphorylation de cette région permet le recrutement de coactivateurs transcriptionnels pouvant remodeler la chromatine et initier la transcription. Par exemple, la région A/B de RAR $\alpha$  peut être phosphorylée et activée par CDK7 (Rochette-Egly, Adam et al. 1997), le récepteur aux androgènes AR peut quant à lui être activé de manière ligand-indépendante par MAPK (Sugita, Kawashima et al. 2004), tout comme le récepteur des estrogènes alpha pouvant être activé de manière ligand indépendant par la phosphorylation de plusieurs sérines par différentes kinases dans la région A/B du récepteur (Lannigan 2003)

#### 4.1.3-Domaine de liaison au ligand

Le domaine de liaison au ligand (LBD) compris dans la région E/F des récepteurs nucléaires est le domaine responsable de la réponse aux signaux hormonaux. Le LBD contrôle la plupart des aspects des récepteurs nucléaires comme la dimérisation, la localisation nucléaire et l'activation de la transcription par le domaine AF-2 (Picard, Salser et al. 1988).

Le LBD des NR est composé de 11 à 13 hélices alpha qui adoptent une structure tridimensionnelle similaire entre les récepteurs malgré les différences substantielles de leurs séquences d'acides aminées (Wurtz, Bourguet et al. 1996; Tanenbaum, Wang et al. 1998). Ces  $\alpha$ -hélices se replient en une structure consistant en une couche d'hélices centrale positionnée entre 2 autres couches d'hélices de chaque côté (Wurtz, Bourguet et al. 1996). Cette structure à 3 étages crée une cavité hydrophobe dans laquelle le ligand va se positionner. La liaison au ligand entraîne d'importants changements conformationnels dans le LBD. L'orientation de l'hélice  $\alpha$  C-terminale (habituellement nommée hélice 12 ou H12) est très sensible à la liaison et à la nature du ligand (Pike, Brzozowski et al. 2000). Cette hélice est une composante essentielle de l'activité



transcriptionnelle dépendante du ligand (AF-2) des récepteurs nucléaires (Darimont, Wagner et al. 1998). Cette hélice est positionnée loin de la pochette de liaison au ligand en absence d'hormone. Lorsqu'une hormone est liée, H12 est repositionné afin de recouvrir le LBD. Ce repliement sur le LBD permet la création d'une surface hydrophobe pouvant être reconnue et liée par des coactivateurs transcriptionnels (Edwards 2000). Ces coactivateurs interagissent aussi avec le domaine AF-2 activé par la liaison de l'hormone et par le repositionnement de l'hélice 12. De plus, le LBD contient un sous-domaine de dimérisation indépendant de la liaison à l'ADN (Glass 1994) formée par les hélices 8, 9, 10 et 11.

### **5-Coactivateurs transcriptionnels**

La fonction des récepteurs nucléaires liés à l'ADN consiste à activer la transcription par le recrutement de divers facteurs permettant au complexe de pré initiation transcriptionnel d'être stabilisé sur le promoteur de gènes régulés par les hormones. Ces facteurs sont nommés coactivateurs transcriptionnels jouent plusieurs rôles dans l'activation de la transcription. Premièrement, les coactivateurs permettent l'ouverture des structures de chromatine hautement organisées limitant l'accès des facteurs de transcription généraux et de l'ARN polymérase II à l'ADN. Deuxièmement, les coactivateurs permettent le recrutement et la stabilisation du complexe de pré initiation sur le promoteur. Les coactivateurs n'ont pas la capacité de lier l'ADN mais sont recrutés aux éléments de réponses aux hormones via des interactions protéines-protéines avec les récepteurs nucléaires. Ces coactivateurs interagissent avec les NR liés à leur ligand via AF-2 ou lient AF-1 de manière hormono-indépendante (Heery, Kalkhoven et al. 1997; Hittelman, Burakov et al. 1999) et participent à l'augmentation, par les mécanismes décrits plus haut, de l'expression des gènes cibles des NR.

#### **5.1-La famille des p160**

Les membres de la famille des p160 ont été identifiés et clonés comme étant des molécules interagissant avec le LBD des récepteurs nucléaires lorsque ceux-ci sont liés à leur ligand. Ces protéines de poids moléculaire de 160 kDa augmentent l'activité transcriptionnelle dépendante du ligand des récepteurs nucléaires lorsque surexprimées

tandis que l'inhibition de ces facteurs réduit l'activité des NR (Torchia, Rose et al. 1997). Trois membres de cette famille ont été identifiés: SRC-1/NCoA, TIF-2/GRIP1/NCoA2/SRC-2 et SRC-3/ACTR/RAC3/AIB1.

### 5.1.1-Structure et fonction de la famille des p160

Les 3 membres de la famille des p160 ont une similarité de séquence de 40%. La conservation de séquence est maximale dans la région amino-terminale contenant le domaine de localisation nucléaire et les domaines bHLH et PAS. Le domaine PAS fonctionne comme domaine de dimérisation pouvant potentiellement permettre l'homou ou l'hétérodimérisation des membres de la famille des p160. Les domaines bHLH-PAS ne sont pas nécessaires pour l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires (Edwards 1999). Deux autres domaines sont aussi conservés entre ces coactivateurs. Il s'agit de 2 NID, ou domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires. Le NID central interagit avec le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires. Ce NID contient 3 sous domaines nommés boîtes NR qui correspondent chacune à un motif très conservé. Ce motif LXXLL (L pour leucine et X pour n'importe lequel acide aminé) permet aux membres de la familles des p160 et à d'autres cofacteurs des récepteurs nucléaires de lier le domaine AF-2 des NR associés à leur ligands (Heery, Kalkhoven et al. 1997). Chaque boîte NR a une spécificité et une affinité différente pour les NR. Cette sélectivité est conférée par les acides aminés flanquant chaque motif LXXLL (Westin, Kurokawa et al. 1998). La structure du motif LXXLL sera discuté dans la prochaine section. Des études cristallographiques démontrent qu'une seule molécule de p160 se lie à un dimère de récepteur nucléaire. Dans le cas de la protéine PPAR $\gamma$ , chaque monomère de NR interagit avec des motifs LXXLL adjacents sur une molécule de p160 (Westin, Kurokawa et al. 1998).

Le deuxième NID se situe en parti carboxy-terminale des p160 et contient un domaine conservé riche en glutamine (Q) (Chen, Lin et al. 1997). Ce domaine permet l'association des p160 au domaine AF-1 des récepteurs nucléaires. En effet, délétion ou mutations du domaine Q-riche de GRIP1/SRC-2 empêchent l'association de ce coactivateur avec le domaine N-terminal du ER $\alpha$  (Ding, Anderson et al. 1998). Les

p160 peuvent donc, en plus de lier les NR de manière dépendante du ligand, lier les récepteurs nucléaires indépendamment du ligand.

Les p160 possèdent 2 domaines fonctionnels permettant l'activation de la transcription. Ces domaines, nommés AD1 et AD2, sont responsables du recrutement de facteurs pouvant remodeler la chromatine et activer la transcription. Le domaine AD1 permet le recrutement des coactivateurs transcriptionnels CREB binding protein (CBP) et son homologue p300. Ces protéines ont toutes deux une fonction d'acétyl transférase des histones (HAT) permettant l'acétylation et la relaxation de la chromatine (Voegel, Heine et al. 1998). Le domaine AD2, quant à lui, permet le recrutement de la protéine CARM1 (coactivator associated arginine methyltransferase 1). CARM1 est une méthyltransferase pouvant méthyler les histones H3 et contribue aussi à relaxer la chromatine (Chen, Ma et al. 1999). Les p160 peuvent aussi recruter le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF par sa sous-unité BAF57. Cette sous unité peut aussi être recrutée directement par le domaine AF-2 des NR (Belandia, Orford et al. 2002). Les coactivateurs SRC1 et AIB1/SRC3 possèdent de plus une activité HAT indépendante du recrutement d'autres cofacteurs. Il a été démontré que SRC1 et 3 peuvent acétyler les histones H3 et H4 non-liées à l'ADN ou en mononucléosomes in vitro (Spencer, Jenster et al. 1997).

### **5.1.2-Modulation de l'activité des membres de la famille des p160**

L'activité pro-transcriptionnelle des membres de la famille des p160 peut être modulée positivement et négativement par des modifications post-traductionnelles. Les p160 sont activées par phosphorylation tandis que l'acétylation de ces coactivateurs inhibent leur fonction.

#### **5.1.2.1-La phosphorylation des p160 augmente leur activité transcriptionnelle**

SRC1, 2 et 3 peuvent tous être phosphorylés par la famille des MAP kinases Erk (Font de Mora and Brown 2000; Rowan, Weigel et al. 2000; Lopez, Turck et al. 2001). En présence du facteur de croissance épithélial EGF, l'activité transcriptionnelle des NR associés aux p160 augmente et ce, indépendamment du domaine AF-1 ligand-

indépendant. Les p160 phosphorylées facilitent le recrutement de p300/CBP, augmentant l'activité HAT du complexe NR/p160 phosphorylé (Font de Mora and Brown 2000).

#### **5.1.2.2-L'acétylation des p160 inhibe leur activité transcriptionnelle**

Il a été démontré que p300/CBP peut acétyler les membres de la famille des p160 (Chen, Lin et al. 1999). L'acétylation de ces coactivateurs a lieu sur des lysines en position adjacente aux domaines LXXLL du NID et aurait un effet disruptif sur l'interaction du p160 avec les récepteurs nucléaires. Il a été proposé que p300/CBP acétylerait les p160 afin de libérer le domaine AF-2 du récepteur nucléaire et permettre le recrutement d'autres cofacteurs essentiels à la transcription après la relaxation de la chromatine (Sharma and Fondell 2002).

#### **5.2-Le motif LXXLL**

Le motif LXXLL est une séquence protéique nécessaire et suffisante pour permettre l'interaction avec la région E/F des récepteurs nucléaires (Heery, Kalkhoven et al. 1997). La présence de ce motif ne se limite pas à la famille des p160, il est retrouvé dans plusieurs corégulateurs de NR comme p300/CBP, TIF1, RIP140 et DRIP205/TRAP220 (Aranda and Pascual 2001). Ces motifs forment de courtes hélices  $\alpha$  amphipatiques avec une surface hydrophobe formée par les 3 leucines. Cette surface interagit avec le LBD des NR. Le LBD lié à son ligand réoriente l'hélice 12, ce qui active la fonction AF-2 en formant un sillon hydrophobe. La surface hydrophobe du motif LXXLL d'un cofacteur va ensuite se positionner dans ce sillon et former plusieurs interactions avec les hélices 3,4 et 12 (Nagy and Schwabe 2004) permettant au cofacteur de moduler l'activité du récepteur nucléaire.

#### **5.3-Rôles des cointégrateurs p300 et CBP dans la fonction transcriptionnelle des facteurs de transcription**

Le facteur p300/CBP est un coactivateur transcriptionnel global ayant la capacité de stimuler la transcription de gènes spécifiques en interagissant directement ou au travers de cofacteurs avec une foule de facteurs de transcription comme les récepteurs

nucléaires, c-Fos, c-Jun, cMyc et CREB (Sternier and Berger 2000). p300/CBP active la transcription de gènes sous le contrôle de ces facteurs en permettant le relâchement de la structure compacte de la chromatine répressive à la transcription par acétylation des histones. L'effet positif de p300/CBP sur la transcription ligand-dépendante du ER $\alpha$  in vitro fonctionne seulement sur des matrices d'ADN sous forme de chromatine et non sur de l'ADN nu (Kraus and Kadonaga 1998). Le facteur p300/CBP purifié in vitro a la capacité d'acétyler fortement la queue amino-terminale des histones 1,2,3 et 4 sans spécificité apparente (Sternier and Berger 2000). CBP/p300 peut aussi agir sur l'acétylation des histones en recrutant l'histone acétyl-transférase P/CAF qui peut acétyler les histones H3 et H4 (Jiang, Lu et al. 1999; Schiltz, Mizzen et al. 1999).

### **5.3.1-Rôles des coactivateurs p300 et CBP dans la fonction transcriptionnelle des récepteurs nucléaires**

Le coactivateur CBP/p300 est recruté par les récepteurs nucléaires de deux façons. Premièrement, p300/CBP contient un motif LXXLL situé dans sa région amino-terminale lui permettant d'interagir avec le LBD des NR (Nilsson, Makela et al. 2001). Deuxièmement, CBP/p300 interagit avec le AD1 des p160 déjà liés au NR par leur NID.

Tel que mentionné plus tôt, CBP/p300 peut aussi moduler négativement l'activité des récepteurs nucléaires. p300/CBP peut acétyler SRC3/AIB1 et empêcher sa liaison aux NR. Cette acétylation a lieu sur 2 lysines adjacentes au LXXLL central du 1er NID et interfère avec les interactions LXXLL/AF-2 (Edwards 1999).

### **5.4-Recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base: Rôle du complexe DRIP/TRAP/ACR/Mediator**

D'autres coactivateurs des NR ont des rôles à jouer à d'autres niveaux que celui de la chromatine. Certains coactivateurs semblent agir directement au niveau du promoteur afin de recruter la machinerie transcriptionnelle de base. Le complexe TRAP/DRIP/ACR/Mediator (nommé ici médiateur pour plus de clarté) fait parti de ce type de coactivateurs. Le médiateur est un complexe hétéromérique contenant de 7 à 25 polypeptides différents (Acevedo and Kraus 2003). Plusieurs de ces polypeptides peuvent agir avec des facteurs associés à l'ARN polymérase II et ce complexe a la

capacité d'augmenter la transcription dépendante du ligand de plusieurs récepteurs nucléaires (Rachez, Suldan et al. 1998). Le complexe médiateur peut être recruté au LBD des NR lié à son ligand par une seule sous-unité du complexe médiateur. La sous-unité DRIP205/TRAP220 contient 2 motifs LXXLL (Malik and Roeder 2000; Rachez, Gamble et al. 2000). DRIP205/TRAP220 interagit avec 13 à 15 protéines du complexe. Le complexe médiateur peut aussi interagir avec le récepteur des estrogènes alpha au travers des sous-unités DRIP 77 et 240, mais de manière plus faible et indépendamment du ligand (Burakov, Wong et al. 2000). Il est à noter que la sous-unité DRIP150 peut aussi interagir avec le domaine AF-1 du récepteur des glucocorticoïdes indépendamment du ligand (Hittelman, Burakov et al. 1999).

La capacité des récepteurs nucléaires à activer la transcription de gènes cible consiste donc à déstabiliser les structures de la chromatine répressives à la transcription par le recrutement d'agents modificateurs des histones (acétylases, méthylases). Lorsque la chromatine se trouve dans un état plus relaxé et donc plus permissif à la transcription, les récepteurs nucléaires, par l'interaction avec le complexe médiateur, recrutent la machinerie transcriptionnelle de base. Ces deux mécanismes agissent de manière synergique sur la chromatine (Acevedo and Kraus 2003).

### **5.5-Corépresseurs transcriptionnels**

Certains récepteurs nucléaires, comme le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) lient leur élément de réponse en l'absence du ligand et agissent comme répresseur de la transcription de leurs gènes cibles. Deux protéines ont été découvertes comme médiant cette inhibition transcriptionnelle. Il s'agit de SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptor) (Chen, Evans, 1995) et NcoR (nuclear corepressor). Ces deux protéines lient un domaine de la région E/F distinct du domaine AF-2 et recrutent des protéines ayant des activités déacétylase des histones. La déacétylation des histones a un effet opposé à celui des acétylases; elle permet à la chromatine de former des structures moins permissives à la transcription (Burke, Baniahmad, 2000).

## 6-Mécanisme d'initiation de la transcription par la machinerie transcriptionnelle générale

L'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II requière l'assemblage séquentiel de plusieurs protéines au site d'initiation. Deux structures du promoteur sont cruciales pour l'initiation de la transcription. Ces deux éléments sont la boîte TATA et la séquence initiatrice (Inr). La boîte TATA (ayant la séquence consensus TATAAA) est habituellement situé de 25 à 30 nucléotides en amont du site d'initiation. La boîte TATA recrute la protéine TBP (TATA binding protein) responsable du recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription. Le Inr est situé au site d'initiation et est lié directement par l'ARN polymérase II ainsi que TFIID au travers de TAF<sub>II</sub>150.

Après avoir lié la boîte TATA, TBP recrute les TAFs (TBP associated factors) et forme le complexe TFIID. Le complexe TFIID, au travers de ses sous unités TAF, a la capacité de lier la boîte TATA, acétyler les histones et de recruter d'autres facteurs généraux de transcription. TFIIA est recruté à la boîte TATA et stabilise le complexe TFIID sur l'ADN. Après la liaison de TFIIA, TFIIB est recruté à la boîte TATA. Le rôle de TFIIB consiste à recruter et à stabiliser l'holoenzyme de l'ARN polymérase II au site de pré-initiation par des interactions directes avec la polymérase II et avec TFIIF. L'holoenzyme est composé de 12 sous-unités de l'ARN polymérase II, de TFIIF, TFIIH et de plusieurs SRB faisant parti du complexe médiateur.

Lorsque l'holoenzyme est stabilisée au site de pré-initiation, TFIIH est activé par TFIIE. TFIIH est le seul facteur général de transcription possédant une activité enzymatique. TFIIH a une activité ATPase dépendante de l'ADN, une activité ADN hélicase dépendante aussi de l'ADN ainsi qu'une activité kinase. L'activité hélicase de TFIIH permet le relâchement des structures "super coil" lors de la phase d'élongation. L'activité kinase de TFIIH permet quant à elle la phosphorylation du domaine carboxy-terminal répété (CTD) de la sous-unité RbpI de l'ARN polymérase II. Cette fonction kinase est activée par TFIIE et certaines sous-unités du complexe médiateur. La phosphorylation de la séquence répétée Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro permet à la polymérase de passer du mode "initiation de la transcription" au mode "élongation de la transcription" (Hampsey 1998).

## **7-Structure et fonction du récepteur des estrogènes alpha**

Le récepteur des estrogènes alpha possède une structure classique commune aux récepteurs nucléaires décrites dans la section 4. ER $\alpha$  possède une région A/B contenant le domaine d'activation AF-1 indépendant du ligand, un DBD inclus dans les régions C et D ainsi que la région E/F contenant le LBD et le domaine d'activation de la transcription dépendante du ligand AF-2.

### **7.1-Domaine AF-2 et activation ligand-dépendante du récepteur des estrogènes alpha**

En absence d'hormones, le ER est séquestré et inactivé par un complexe de chaperones moléculaires (Pike, Brzozowski et al. 2000). La liaison de ligands estrogéniques comme le 17- $\beta$ -estradiol (E2) au LBD induit des changements structuraux permettant la dissociation du complexe inhibiteur et facilite l'homodimérisation, la liaison de séquences d'ADN régulatrices des gènes cibles et le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. Tel qu'expliqué dans la section 4.1.3, le ligand du récepteur des estrogènes se fixe dans la poche hydrophobe du LBD et cette liaison change la conformation des 12 hélices du LBD. Une interface formée par les hélices 8, 9, 10 et 11 permet la dimérisation du récepteur. L'hélice 12 est aussi repositionnée au dessus de la poche hydrophobe de liaison du ligand. Ce repositionnement permet l'activation de AF-2 en exposant un site de liaison des coactivateurs. Ce domaine est un sillon hydrophobe formé par hélices 3, 4, 5 et 12. Ce sillon interagit avec les hélices  $\alpha$  amphipatiques formées par les motifs LXXLL des boîtes NR de coactivateurs du ER (Pike, Brzozowski et al. 2000; Pike, Brzozowski et al. 2000).

### **7.2-Domaine AF-1 et activation indépendante du ligand du récepteur des estrogènes alpha**

Le domaine d'activation AF-1 est constitué des régions A et B du récepteur des estrogènes alpha et est régulé par la phosphorylation de diverses sérines contenu dans ces régions. Le domaine AF-1 peut agir sur la transcription indépendamment de la liaison du ligand sur le LBD pour la fraction du ER $\alpha$  qui se retrouve liée à l'ADN en



absence d'hormone et son activation synergise avec AF-2 pour conférer une activité maximale au ER $\alpha$  (Kraus, McInerney et al. 1995; Gandini, Kohno et al. 1997).

### **7.2.1-L'activité indépendante du ligand de ER $\alpha$ est régulée par la phosphorylation du domaine AF-1**

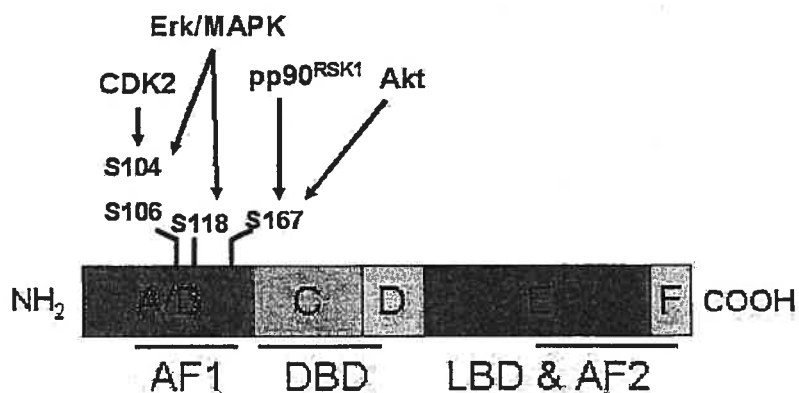
L'activité transcriptionnelle du domaine AF-1 est régulée par la phosphorylation de 4 sérines clé. La mutation en alanine des sérines en position 104, 106, 118 et 167 diminue l'activité transcriptionnelle de ER $\alpha$  dépendante et indépendante du ligand (Lannigan 2003). En plus d'être phosphorylé indépendamment du ligand, la liaison du ER $\alpha$  à l'estradiol peut amener la phosphorylation du récepteur (Ali, Metzger et al. 1993).

#### **7.2.1.1-Phosphorylation du ER $\alpha$ dépendante de la liaison au ligand**

Il a été démontré que la sérine 118 du ER $\alpha$  est phosphorylée peu après la liaison du récepteur à son ligand (Ali, Metzger et al. 1993). La phosphorylation de cette sérine est augmentée par le facteur général de transcription TFIID lorsque le récepteur est lié à son ligand (Chen, Riedl et al. 2000). La surexpression de TFIID augmente la phosphorylation de la sérine 118 du ER $\alpha$  de manière dose-dépendante et la présence d'estradiol augmente cet effet. Il a été démontré *in vitro* que la protéine CDK7 purifiée pouvait faiblement interagir et phosphoryler le récepteur des estrogènes alpha. CDK7 fait partie d'un complexe incluant TFIID, p62 et XPD. Le domaine AF-2, lorsqu'il est activé, recrute ces 3 sous unités, ce qui permet à la kinase CDK7 de phosphoryler la sérine 118 (Chen, Riedl et al. 2000). Cette phosphorylation dépendante du ligand permet aux 2 domaines d'activation d'agir coopérativement pour une activation maximale de la transcription.

### 7.2.1.2-Phosphorylation du ER $\alpha$ par diverses kinases indépendamment de la liaison au ligand

L'activité du récepteur des estrogènes  $\alpha$  peut être modulée par d'autres facteurs que les hormones estrogéniques. Plusieurs voies de signalisation cellulaires peuvent influencer l'activité transcriptionnelle du domaine AF-1.



**Fig.3. L'activation de AF-1 dépend de la phosphorylation de 4 sérines dans la région A/B phosphorylées par différentes kinases**

Le domaine AF-1 du ER $\alpha$  est activé par la phosphorylation de 4 sérines clés en position 104, 106, 118 et 167. Ces sérines sont phosphorylées par différentes kinases. CDK2 phosphoryle les sérines en positions 104 et 106 tandis que la MAP kinase Erk phosphoryle les sérines en position 104, 106 et 118. La sérine en position 167 peut être phosphorylée par pp90<sup>RSK1</sup> et Akt.

Le récepteur des estrogènes alpha peut être activé par les facteurs de croissance au travers de la voie des MAP kinases en absence d'estradiol (Kato, Endoh et al. 1995). En effet, la sérine en position 118 du récepteur des estrogènes fait parti de la séquence PQLSP, une séquence qui correspond au motif consensus PX<sub>n</sub>S/TP reconnu et phosphorylé par les MAP kinases Erk1 et 2 (Gonzalez, Raden et al. 1991). Le traitement de différents types cellulaires avec le facteur de croissance épithélial EGF reconnu pour activer Erk augmente l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  en présence ou en absence de ligand et la mutation en alanine de la sérine 118 abolit partiellement cet effet (Bunone, Briand et al. 1996). De plus, tout comme la sérine en position 118, les sérines en position 104 et 106 peuvent se faire phosphoryler par la MAP kinase Erk (Lannigan 2003).

Il a été démontré que le complexe cycline A-CDK2 pouvait phosphoryler le récepteur des estrogènes de manière dose-dépendante. L'analyse du patron de

phosphorylation du ER $\alpha$  dont les sérines 104, 106 et 118 ont été mutées en alanines ont démontré que l'effet du complexe cycline A-CDK2 sur le ER $\alpha$  était dépendant des sérines 104 et 106 et non de la sérine en position 118 (Rogatsky, Trowbridge et al. 1999). Cet effet du complexe cycline A-CDK2 suggère une association entre l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  et la progression du cycle cellulaire.

Le traitement au EGF peut aussi activer le ER $\alpha$  par la phosphorylation de la sérine en position 167. La protéine pp90<sup>RSK</sup> est une kinase qui phosphoryle la sérine 167 contenu dans le motif RLAS (Joel, Smith et al. 1998). pp90<sup>RSK</sup> est phosphorylée et activée par Erk1/2 et est transportée au noyau où elle reconnaît et phosphoryle les séquences de type RxxS (Chen, Tung et al. 1993).

Une autre kinase peut phosphoryler la sérine en position 167 du ER $\alpha$ . Il s'agit de la kinase Akt/PKB (Campbell, Bhat-Nakshatri et al. 2001). Akt est un effecteur de la voie de la PI 3-kinase et reconnaît et phosphoryle un domaine similaire à celui reconnu et phosphorylé par pp90<sup>RSK</sup>. Un domaine similaire au domaine consensus RxRxxS/T (Brunet, Bonni et al. 1999) reconnu par Akt se retrouve dans la région de la sérine 167. La séquence RLASTND est reconnue et phosphorylée par Akt, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  (Campbell, Bhat-Nakshatri et al. 2001).

## **7.2.2-Coactivateurs de la fonction transcriptionnelle AF-1 du ER $\alpha$**

Tout comme le domaine AF-2, le domaine AF-1 recrute des coactivateurs lorsque celui-ci est activé. Le récepteur des estrogènes alpha recrute des coactivateurs spécifiques au domaine AF-1. Ce domaine peut aussi recruter des coactivateurs ayant une spécificité double pour le domaine AF-1 et AF-2, comme les membres de la famille des p160.

### **7.2.2.1-Coactivateurs de la fonction AF-1 de ER $\alpha$ dépendants de la phosphorylation: SRA et p68/p72**

SRA (steroid RNA activator) est un coactivateur qui module l'activité des récepteurs nucléaires en se liant au domaine AF-1 (Lanz, McKenna et al. 1999). L'effet positif de SRA est accentuée par l'activation de la MAP kinase Erk et est abolit par la mutation en alanine de la sérine en position 118 du ER $\alpha$  (Lanz, McKenna et al. 1999;

Deblois and Giguere 2003). SRA est retrouvé par immunoprécipitation dans le même complexe ribonucléique que SRC-1 et semble coopérer avec ce coactivateur pour induire l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  en absence de ligand (Deblois and Giguere 2003).

Deux hélicases d'ARN, p68 et p72, peuvent aussi lier et co-activer le domaine AF-1 des récepteurs nucléaires (Endoh, Maruyama et al. 1999). Ces membres de la famille des protéine à boîte DEAD interagissent avec ER $\alpha$ , avec les membres de la famille des p160 SRC-1 et SRC-2, avec le facteur CBP/p300 ainsi qu'avec le SRA. Ces facteurs agissent de manière synergistique afin d'activer ER $\alpha$  en absence de ligand (Watanabe, Yanagisawa et al. 2001). p68 et p72 lient la région A/B du ER $\alpha$  et le domaine AD2 des p160. La liaison de ces hélicases au ER $\alpha$  est augmentée lorsque la sérine 118 du récepteur est phosphorylée (Watanabe, Yanagisawa et al. 2001).

#### **7.2.2.2-Coactivateurs de la fonction AF-1 de ER $\alpha$ indépendants de la phosphorylation: Famille des p160**

Les coactivateurs membres de la famille des p160 sont aussi en état d'interagir avec la région A/B du ER $\alpha$ . Cette interaction est directement médiée par le domaine C-terminal riche en glutamine des p160 (Darimont, Wagner et al. 1998). Contrairement à SRA et p68/p72, la mutation en alanine de la sérine en position 118 du ER $\alpha$  n'influence pas la liaison des p160 à AF-1. En fait, la mutation en alanine de toutes les sérines du domaine AF-1 (104, 106, 118 et 167) n'influence aucunement le recrutement de SRC-1 et SRC-2 à AF-1 (Metivier, Penot et al. 2001).

La phosphorylation du récepteur des estrogènes alpha ne permet donc pas au domaine AF-1 de recruter directement les coactivateurs de la famille des p160. Ces coactivateurs peuvent se retrouver dans le complexe activateur phospho-dépendant par un recrutement indirect au domaine AF-1 par l'intermédiaire de p68, p72 et SRA.

Peu de données sont disponibles sur l'effet de la phosphorylation des sérines du ER $\alpha$  en position 104, 106 et 167 sur le recrutement de cofacteurs transcriptionnels au domaine AF-1.

### 7.3-Éléments de réponse aux estrogènes

Afin d'activer la transcription, le récepteur des estrogènes alpha doit lier des séquences d'ADN spécifiques dans les régions promotrices des gènes cibles des estrogènes. Il existe différents éléments de réponse aux estrogènes: Les éléments de réponse aux estrogènes classiques (ERE) palindromiques, les éléments de réponse composites où le ER $\alpha$  lié à l'ADN interagit avec d'autres facteurs de transcription eux aussi liés à l'ADN ainsi que les éléments de réponse ne nécessitant pas d'interaction avec l'ADN où ER $\alpha$  agit comme coactivateur.

#### 7.3.1-Les éléments de réponse classique aux estrogènes

L'élément de réponse aux estrogènes classique est une séquence d'ADN palindromique contenant 2 motifs répétés PuGGTCA (où Pu est une purine) séparés par 3 nucléotides. La séquence consensus du ERE est donc PuGGTCANNNTGACCPy (où Pu est une purine, N est n'importe lequel nucléotide et Py une pyrimidine). Ces éléments sont liés par un dimère de ER où le DBD de chaque récepteur interagit avec un motif PuGGTCA (Sanchez, Nguyen et al. 2002). Les déviations de la séquence consensus du demi site PuGGTCA diminuent l'affinité du ER pour ce site (Klinge 2001; Bourdeau, Deschenes et al. 2004). Peu de promoteurs dans le génome humain contiennent des palindromes consensus considérés "parfaits". La divergence de séquence reste quand même permissive à la liaison du ER à un ERE imparfait et à l'activation du gène sous le contrôle de cet ERE (Sanchez, Nguyen et al. 2002). Le récepteur des estrogènes peut aussi lier des demi sites PuGGTCA, mais avec une affinité beaucoup moins grande qu'à un palindrome (Dana, Hoener et al. 1994). La présence de plusieurs demi-sites peuvent par contre coopérer pour la liaison du ER au promoteur et à l'expression de gènes cibles (Martini and Katzenellenbogen 2001).

#### 7.3.2-Éléments de réponse aux estrogènes non-classiques

Tel que mentionné dans la section 7.2, le récepteur des estrogènes alpha n'active pas la transcription de ses gènes cibles seulement en liant des séquences ERE sur l'ADN. ER $\alpha$  a la capacité d'activer la transcription de gènes cibles en interagissant et en promouvant l'activité d'autres facteurs de transcription. Le récepteur des estrogènes

alpha peut interagir et activer ces facteurs de transcription lorsque liés à l'ADN (éléments de réponses composites) ou sans lier l'ADN, agissant comme coactivateur d'autres facteurs de transcription.

### **7.3.2.1-Élément de réponse composite: Séquences riches en GC et rôle de SP1**

Un nombre croissant de gènes répondant aux estrogènes contiennent un motif individuel PuGGTCA associé avec des régions riches en GC de séquence GGGGCGGGG nommées boîtes GC (Sanchez, Nguyen et al. 2002). Ces boîtes GC sont liées par le facteur de transcription SP1. SP1 est un membre de la famille des facteurs de transcription de type SP/xKLF ou "Krüppel-like factors" (Raychowdhury, Schafer et al. 2002). Les membres de cette famille reconnaissent et lient la séquence consensus GGGGC/TGGGG. Ces séquences sont importantes pour l'expression de gènes ubiquitaires ainsi que l'expression tissu-spécifique et virale (Suske 1999). SP1 possède de plus un rôle dans le maintien de l'expression de gènes de ménage n'ayant pas de boîte TATA (Smale, Schmidt et al. 1990).

SP1 est une phosphoprotéine dont l'activité peut être modulée par plusieurs kinases. La MAP kinase Erk peut par exemple phosphoryler la thréonine située en position 266 de SP1, qui permet l'augmentation de l'affinité de SP1 aux boîtes GC (Merchant, Du et al. 1999).

Le facteur de transcription SP1 peut s'associer au récepteur des estrogènes alpha. Cette interaction est indépendante de la liaison des estrogènes et requiert un domaine dans la région C du récepteur. L'interaction avec le récepteur n'est pas suffisante pour augmenter la transcription, la liaison des estrogènes au récepteur est nécessaire pour l'activation de gènes sous le contrôle d'un demi ERE et d'une boîte GC. L'intégrité des deux domaines d'activation du ER $\alpha$  AF-1 et AF-2 est essentielle à cette activation transcriptionnelle (Porter, Saville et al. 1997).

La présence d'un demi ERE sur l'ADN semble dispensable pour que les estrogènes activent l'expression de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'une boîte GC. Il a été démontré que la liaison du ER à un demi-ERE augmente la liaison de SP1 à sa boîte GC (Saville, Wormke et al. 2000). Les rôle des demi ERE serait de recruter le

récepteur des estrogène alpha à l'ADN et de recruter à son tour SP1 à une boîte GC adjacente (Sanchez, Nguyen et al. 2002).

### **7.3.2.2-Élément de réponse non-classique: Élément de réponse au TPA et rôle du facteur de transcription AP-1**

Plusieurs gènes ne contenant ni ERE ni demi-ERE ont été caractérisés comme étant des gènes sensibles aux estrogènes. Cette activité estrogénique au promoteur serait médiée par le ER, en interagissant avec des facteurs de transcription liés au promoteur au lieu de s'associer directement à l'ADN.

Le ER $\alpha$  peut s'associer avec le facteur de transcription AP-1 et moduler son activité en présence d'estradiol (Philips, Chalbos et al. 1993) comme sur les gènes IGF-1 (Umayahara, Kawamori et al. 1994; Kajimoto and Umayahara 1998) et cMyc (Iavarone, Catania et al. 2003).

Le facteur de transcription AP-1 est composé d'un homodimère des membres de la famille Jun (c-Jun, JunB, JunD) ou un d'un hétérodimère entre les membres de la famille des Jun et des Fos (c-Fos, FosB, Fra1, Fra2) (Abate, Luk et al. 1990). Ces dimères lient un site consensus sur l'ADN de séquence TGA $\overline{C}$ TCA (Lee, Mitchell et al. 1987) nommée site AP-1 ou TRE (TPA response element). Le TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate) est un composé ayant comme propriété la capacité de promouvoir la différenciation et la croissance de cellules tumorales en activant la voie de signalisation de la PKC et le facteur de transcription AP-1.

#### **7.3.2.2.1-Régulation de l'activité de AP-1**

AP-1 est impliqué dans plusieurs processus cellulaires incluant la différenciation, l'apoptose, la transformation et la prolifération cellulaire selon le type de cellule (Kouzarides and Ziff 1988). L'activité de AP-1 est aussi cruciale pour la croissance de cellules cancéreuses: Un mutant dominant-négatif de c-Jun inhibe la prolifération stimulée par les estrogènes et les facteurs de croissance dans des cellules de carcinomes mammaires MCF-7 (Liu, Ludes-Meyers et al. 2002). La microinjection d'anticorps dirigés contre c-Fos dans les fibroblastes bloque le cycle cellulaire en phase S (Riabowol, Vosatka et al. 1988). 40% des des souris homozygotes knockout pour c-Fos

meurent durant la période de développement embryonnaire et les souris qui survivent ont de sévères problèmes de développement osseux mais n'exhibent par contre pas de différences de croissance comparées aux souris de type sauvage (Johnson, Spiegelman et al. 1992). Il est possible que les autres membres de la famille Fos ayant une fonction redondante puissent compenser pour l'absence de c-Fos au niveau de l'organisme. Par exemple, les cellules fibroblastiques dérivées de souris knock-out pour c-Fos et FosB prolifèrent moins rapidement que des fibroblastes de types sauvages (Brown, Nigh et al. 1998).

AP-1 intègre les signaux extracellulaires mitogéniques et de stress cellulaire au niveau transcriptionnel (Schiff, Reddy et al. 2000). L'activité de AP-1 est principalement régulée par les voies de signalisation intracellulaires activées par les récepteurs à la membrane plasmique. AP-1 est principalement régulé par les voies des MAP kinases Erk, p38 et JunK (Whitmarsh and Davis 1996).

#### **7.3.2.2.1.1-Régulation de l'activité transcriptionnelle de c-Fos**

c-Fos, tout comme c-Jun, fait partie du groupe de gènes nommés "immediate early genes" dont la transcription est immédiatement induite après une stimulation cellulaire au stress (UV) ou aux facteurs de croissance.

Le premier niveau de régulation de l'activité de c-Fos par les MAP kinases se fait au niveau transcriptionnel. Le promoteur de c-Fos contient 3 éléments pouvant être influencés par l'activation de voies intracellulaires: Un élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE), un élément de réponse au sérum (SRE) et un élément inductible par sis (SIE) (Janknecht, Cahill et al. 1995).

Erk, un effecteur de la voie Ras/Raf MAP kinase peut phosphoryler et activer le facteur de transcription Elk1 (Marais, Wynne et al. 1993) qui s'associe aux facteurs de transcription de réponse au sérum (SRF) liés au SRE du promoteur de c-Fos. Les MAP kinases p38 et JNK (Jun N-terminal kinase) peuvent aussi activer et phosphoryler Elk1 (Janknecht, Cahill et al. 1995). De plus, Erk peut aussi phosphoryler STAT1 et 3, ce qui augmente leur activité transcriptionnel au site SIE du promoteur de c-Fos (Ihle 1996).



L'activité de c-Fos est aussi modulée par des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de c-Fos au niveau des thréonines en position 362 et 374 augmente son activité. La stimulation des cellules avec des facteurs de croissance ne fait pas qu'activer la transcription de c-Fos, elle permet aussi l'activation directe de cette protéine en activant la kinase pp90<sup>RSK1</sup> par la voie Ras qui phosphoryle les thréonines 362 et 374 (Chen, Abate et al. 1993; Deng and Karin 1994).

#### **7.3.2.2.1.2-Régulation de l'activité transcriptionnelle de c-Jun**

Deux TRE sont présents dans le promoteur de c-Jun. Ces éléments sont liés préférentiellement par l'hétérodimère formé par c-Jun et ATF-2 (Whitmarsh and Davis 1996). La protéine c-Jun module donc positivement son activité en influençant sa propre transcription. L'activité de c-Jun peut être modulée par phosphorylation. La phosphorylation des sérines de c-Jun en positions 63 et 73 augmente son activité transcriptionnelle en favorisant le recrutement de CBP/p300 (Arias, Alberts et al. 1994). c-Jun est phosphorylé par les MAP kinases JNK (c-jun N-terminal kinase) (Derijard, Hibi et al. 1994) et p38 (Whitmarsh and Davis 1996).

#### **7.3.2.2.1-Collaboration entre les facteurs de transcription ER $\alpha$ et AP-1**

Il a été postulé que les effets prolifératifs du ER $\alpha$  seraient principalement effectués au travers du facteur de transcription AP-1 (Kushner, Agard et al. 2000), facteur responsable de l'intégration des signaux mitogéniques extracellulaires au niveau de la transcription.

Le récepteur des estrogènes interagit avec AP-1 en liant c-Jun et cette interaction ne nécessite pas la liaison du ER $\alpha$  à l'ADN. En effet, ER $\alpha$  ayant une mutation dans le 1er doigt de zinc du DBD empêchant son association à l'ADN peut toujours interagir avec c-Jun. Cette interaction s'effectue par la région D du récepteur et nécessite la présence de la région C même si celle-ci ne peut plus s'associer à un ERE (Jakacka, Ito et al. 2001). L'effet activateur de l'estradiol nécessite la présence des 2 domaines d'activation AF-1 et AF-2. En présence d'estradiol, ER $\alpha$  associé à AP-1 peut recruter le coactivateur SRC-2/GRIP1 au complexe, ce qui permettrait d'activer la transcription

(Teyssier, Belguise et al. 2001). Il n'a pas encore été déterminé si l'interaction ER $\alpha$ -AP1 est induite par les estrogènes.

#### **7.4-Actions non-génomiques du ER $\alpha$**

Certains effets des estrogènes s'effectuent à l'intérieur d'une trop courte période de temps pour être effectuée par l'action de gènes ayant été transcrit et traduits. Différents processus cellulaires comme la production de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) (Razandi, Pedram et al. 2000), la production d'oxide nitrique (Prevot, Croix et al. 1999), l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (Morley, Whitfield et al. 1992) et l'activation de la kinase c-Src (Migliaccio, Di Domenico et al. 1996) sont modulés très rapidement après une stimulation à l'estradiol sans être affectés par les inhibiteurs de la transcription et peuvent être inhibés par les antiestrogènes totaux (ICI) (Simoncini, Fornari et al. 2002). Le récepteur influence ces processus par l'activation directe de voies de signalisation intracellulaires. 2 voies ont été caractérisées comme voies activées par les estrogènes indépendamment de la transcription, il s'agit de la voie des MAP kinases Raf/Erk et de la voie de la PI 3-kinase/Akt. Ces deux voies sont expliquées en détail dans les sections 10 et 11.

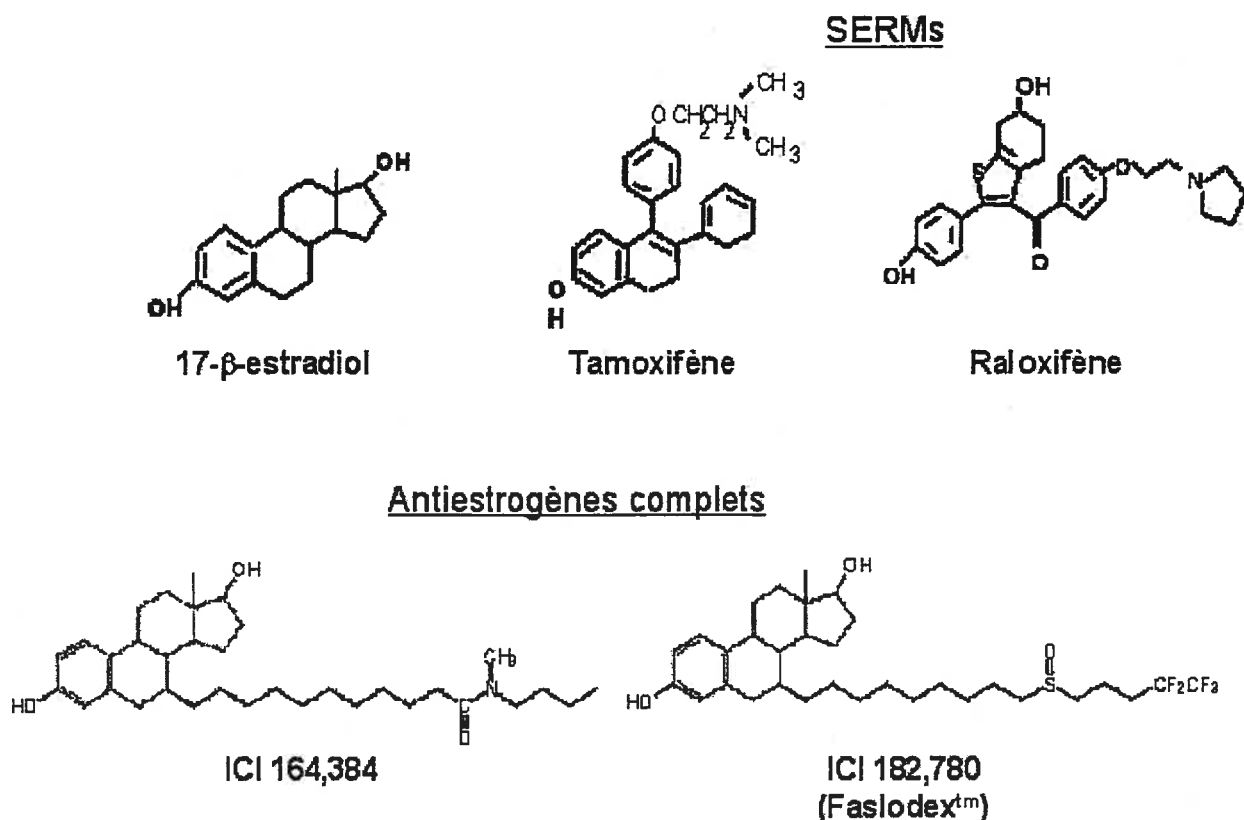
ER $\alpha$  interagit directement avec la sous unité régulatrice p85 de la PI 3-kinase lorsque lié à l'estradiol. Cette interaction permet l'activation de la sous unité catalytique p110 de PI 3-kinase, la production de PIP<sub>3</sub> et l'activation de la kinase effectrice Akt (Simoncini, Hafezi-Moghadam et al. 2000). ER $\alpha$  peut aussi activer la voie des MAP kinases Raf/Erk de différentes façons. ER $\alpha$  lié à son ligand peut interagir avec la protéine adaptatrice Shc ce qui induit sa phosphorylation et permet le recrutement de Grb2 et SOS qui active Ras qui active à son tour Raf (Song, McPherson et al. 2002). ER $\alpha$  peut aussi activer c-Src au travers de la protéine d'échafaudage MNAR qui amène l'activation de la voie des MAP kinases Raf/Erk (Migliaccio, Di Domenico et al. 1996; Migliaccio, Piccolo et al. 1998; Wong, McNally et al. 2002).

## **8-Modulation de la fonction du récepteur des estrogènes lors du traitement du cancer du sein**

Tel que mentionné plus tôt, seulement 6 à 10% des tissus mammaires épithéliaux normaux expriment le récepteur des estrogènes alpha tandis qu'environ 60% des tumeurs mammaires expriment ce récepteur (Dickson and Lippman 1988; Jacquemier, Hassoun et al. 1990). Les estrogènes ont la capacité d'augmenter la prolifération cellulaire des carcinomes mammaires et cette prolifération est médiée par l'activation du récepteur des estrogènes alpha (Dickson and Lippman 1988; Kushner, Agard et al. 2000).

Le blocage de la propriété proliférative des estrogènes dans les tumeurs mammaires permet le ralentissement, voir même l'arrêt de la croissance tumorale. Le récepteur des estrogènes alpha étant l'agent médiateur des effets prolifératifs des estrogènes, il est devenu très rapidement évident que cette protéine était une cible thérapeutique de choix pour le traitement spécifique du cancer du sein.

Deux classes de médicaments ont été développées spécifiquement afin de pouvoir bloquer l'action du récepteur des estrogènes alpha dans les cellules cancéreuses. Ces deux classes sont les antagonistes du récepteur des estrogènes et les inhibiteurs d'aromatase (Jordan 2004). Les antagonistes du ER ou antiestrogènes, sont des composés ayant une structure similaire à l'estradiol pouvant lier le récepteur et inhiber sa fonction transcriptionnelle (Brzozowski, Pike et al. 1997). Les inhibiteurs d'aromatase quant à eux créent un environnement sans estrogènes où le ER ne peut plus être activé par son ligand en inhibant la synthèse des estrogènes dans l'organisme (Campos 2004).



**Fig.4 Structure moléculaire d'agonistes et antagonistes du récepteur des estrogènes**  
Le récepteur des estrogènes est un facteur de transcription dépendant de la liaison de ligands telle le 17- $\beta$ -estradiol pour son activation. Afin de bloquer le rôle prolifératif de cette hormone dans les cancers du sein, plusieurs composés ont été développés.

### 8.1- Antagonistes du récepteur des estrogènes: SERMs

Les SERMs, pour Selective Estrogen Receptor Modulator sont une classe de molécules structurellement diversifiées ayant la propriété de lier et de moduler l'activité du récepteur des estrogènes. Par exemple, le tamoxifène est un composé dérivé du triphenyléthylène (Conzen 2003). Les SERMs sont des analogues des stéroïdes ayant la capacité de se lier au LBD du récepteur. La chaîne latérale des SERMs induit des changements conformationnels dans le récepteur des estrogènes alpha qui résulte en l'inhibition de la fonction activatrice AF-2 (Pike, Brzozowski et al. 2000). La liaison de ces composés permet toujours la dimérisation et l'association du ER $\alpha$  aux sites ERE sur l'ADN (Hanstein, Djahansouzi et al. 2004). Les SERMs sont des antagonistes partiels. Ces antagonistes n'ont pas d'effets sur l'activité du domaine AF-1 et n'inhibent pas

complètement l'activité du récepteur des estrogènes. Les SERMs peuvent avoir des effets différents dans différents tissus et organes. Certains effets sont antiestrogéniques comme l'activité inhibitrice de la prolifération des tumeurs mammaires du tamoxifène et du raloxifène, mais d'autres peuvent être estrogéniques comme la propriété du tamoxifène et du raloxifène à conserver la masse osseuse ou diminuer le cholestérol circulant ou l'activité proliférative du tamoxifène sur les cellules utérine endométriales (Ismail 1998; Kuiper, van den Bemd et al. 1999; Bergman, Beelen et al. 2000).

### **8.1.2-Mécanisme d'inactivation du ER $\alpha$ par les SERMs**

Plus précisément, les SERMs lient la pochette de liaison du ligand de ER $\alpha$  de manière similaire à l'estradiol. Par contre, leur chaîne latérale (voir figure 4 pour la structure des SERMs raloxifène et tamoxifène) sort de la pochette de liaison au ligand. Cette protubérance empêche l'hélice 12 de se repositionner sur la poche de liaison du ligand, ce qui inhibe le domaine AF-2 et le recrutement des coactivateurs (Brzozowski, Pike et al. 1997; Hubbard, Pike et al. 2000; Pike, Brzozowski et al. 2000; Pike, Brzozowski et al. 2000). L'hélice 12 est réorientée vers les hélices 3 et 4 qui forment le domaine de liaison aux coactivateurs. L'hélice 12 repositionnée ainsi par les SERMs va lier le domaine de liaison aux coactivateurs par sa propre séquence hydrophobe. L'hélice 12 possède une pseudo-séquence LxxLL de type LLEML (Shiau, Barstad et al. 1998). Ce pseudo-motif LxxLL compétitionne avec les boîtes NR des coactivateurs pour la liaison du ER $\alpha$  (Gangloff, Ruff et al. 2001).

#### **8.1.2.1-Le tamoxifène et le traitement du cancer du sein**

Le tamoxifène est un triphényléthylène utilisé dans le traitement du cancer du sein. Il est le composé le plus largement utilisé pour le traitement des femmes post-ménopausées depuis son approbation par la Food And Drug Agency en 1986 (1998). Des études cliniques sur les effets préventifs du tamoxifène ont montré que ce traitement diminuait le risque de cancer du sein invasif de 49% et les cancers du sein étendus aux nodes lymphatiques de 69% (Fisher, Costantino et al. 1998). Un traitement de 5 ans au tamoxifène confère aux patientes une augmentation des chances de survie se prolongeant pour environ 5 ans après la discontinuation du traitement (1998). L'analyse

d'essais cliniques aléatoires suggèrent que des milliers de femmes sont vivantes aujourd'hui grâce à l'utilisation constante du tamoxifène (1998; Osborne 1998; Jordan 2004).

#### **8.1.2.1.1-Propriétés agonistes du tamoxifène**

Le tamoxifène reste un antagoniste partiel du récepteur des estrogènes et peut avoir des effets estrogéniques dans d'autres tissus que les tissus mammaires et cette propriété agoniste peut causer des effets secondaires bénéfiques ou néfastes. Les effets agonistes bénéfiques du tamoxifène consistent à diminuer les niveaux de cholestérol circulant et d'augmenter la densité osseuse chez les femmes post-ménopausées (Reis, Costantino et al. 2001). Malheureusement, des études cliniques ont montré qu'une longue exposition au tamoxifène augmente les risques de développer un cancer de l'utérus (Ismail 1998; Lasset, Bonadona et al. 1998; Bergman, Beelen et al. 2000). Des données de laboratoire corroborent cette observation. Plusieurs études ont démontrées que le tamoxifène augmente la prolifération de lignées cellulaires utérines animales et humaines (Anzai, Holinka et al. 1989; Jamil, Croxtall et al. 1991). D'autres études ont démontré que le tamoxifène a des propriétés agonistes sur la transcription de gènes sous le contrôle de ERE (Watanabe, Inoue et al. 1997; Barsalou, Gao et al. 1998) et de sites AP-1 (Webb, Lopez et al. 1995).

O'Malley propose que la particularité du tamoxifène à être antagoniste dans certains types cellulaires et agoniste dans d'autres est causée par une différence dans la balance coactivateurs sur corépresseurs (Smith, Nawaz et al. 1997). La présence augmentée de certains coactivateurs comme les membres de la famille des p160 pourrait conférer au tamoxifène un effet activateur de la transcription.

Brown, reprend l'idée de O'Malley pour expliquer l'effet agoniste du tamoxifène sur les gènes cibles du ER sous le contrôle d'un élément de réponse non-classique de type AP-1 dans les cellules Ishikawa. Brown démontre que la haute expression du coactivateur de la famille des p160 SRC-1 confère un effet agoniste au tamoxifène au niveau de la transcription de gènes sous le contrôle d'éléments de réponse non-classiques et au niveau de la prolifération cellulaire (Shang and Brown 2002). La seule

expression de SRC-1 exogène dans les MCF-7 permet au tamoxifène d'activer la transcription des gènes cMyc et d'IGF-1 sous le contrôle transcriptionnel d'un site AP-1.

Kushner et al. ont démontré que l'effet agoniste du tamoxifène sur un promoteur de type AP-1 est indépendant des 2 fonctions activatrices du ER $\alpha$  (Webb, Nguyen et al. 1999). La délétion de AF1 (ER $\alpha$   $\Delta$ 1-109) augmente l'effet agoniste du tamoxifène sur un site AP-1 suggérant une indépendance à cette fonction activatrice. De plus, la mutation de la lysine 362 en alanine du domaine AF-2 rendant ER $\alpha$  inactif lorsque lié à E2 ne modifie pas l'activité agoniste du tamoxifène suggérant ainsi une indépendance à la fonction activatrice ligand-dépendante. Kushner propose ainsi 2 modèles différents pour expliquer les effets des estrogènes (AF dépendant) et du tamoxifène (AF indépendant) sur un site AP-1. Le premier suggère que, sous traitement estradiol, le ER $\alpha$  (possiblement lié à Jun) interagit avec des membres de la famille des p160 par ses domaines AF-1 et AF-2, recrutant et/ou stabilisant ces coactivateurs au site AP-1 pour promouvoir le remodelage de la chromatine et l'activation de la transcription. Le modèle indépendant des fonctions activatrices suggère que le ER $\alpha$  lié au tamoxifène séquestre des corépresseurs transcriptionnels. Ces corépresseurs liés à ER $\alpha$  seraient dans l'impossibilité d'interagir avec cJun et cFos et d'inhiber leur activité transcriptionnelle (Webb, Nguyen et al. 1999).

#### **8.1.2.1.2-Résistance au tamoxifène**

Tel que mentionné dans la section 9.2.1.1, un traitement de 5 ans au tamoxifène confère aux patientes une augmentation des chances de survie se prolongeant pour environ 5 ans après la discontinuation du traitement (1998). Malheureusement, une exposition supérieure à 5 ans entraîne l'émergence de cancers métastatiques résistants au tamoxifène (Fisher, Dignam et al. 1996). Presque 50% des cancers du sein, malgré la présence du ER $\alpha$  cessent de répondre au tamoxifène (Schiff, Massarweh et al. 2003). Il s'agit là d'une réaction acquise.

La résistance aux antiestrogènes peut être aussi intrinsèque (Clarke, Liu et al. 2003). La résistance intrinsèque consiste principalement au développement d'une tumeur

primaire n'exprimant pas le récepteur des estrogènes alpha. Les cellules tumorales n'exprimant pas de ER dépendent d'autres facteurs que le récepteur des estrogènes pour leur croissance et le blocage du ER dans ce cas devient inutile.

L'expression du ER $\alpha$  et du récepteur de la progestérone (PR) dans une tumeur sont de bons éléments de prédiction de la capacité qu'ont les tumeurs mammaires à répondre aux antiestrogènes (Clarke, Liu et al. 2003). PR est un gène cible de ER, l'induction de l'expression de PR en présence d'estrogène est considéré comme indicateur d'un récepteur des estrogènes fonctionnel (Sommer, Hoffmann et al. 2003). Environ 75% des tumeurs ER+/PR+ répondent au tamoxifène tandis qu'environ seulement 34% des tumeurs ER+/PR- répondent au tamoxifène.

Les mécanismes de résistance au tamoxifène acquis sont peu compris et caractérisés à ce jour. Il a par contre été démontré que le ER $\alpha$  est toujours exprimé lors de la progression des tumeurs (Berstein, Zheng et al. 2003). La perte du ER $\alpha$  dans un contexte de résistance au tamoxifène n'est observé que dans 25% des tumeurs (Kuukasjarvi, Kononen et al. 1996). La perte de l'expression du ER $\alpha$  ne semble pas être le mécanisme majeur de l'acquisition de la résistance au tamoxifène.

L'accumulation de données cliniques et moléculaires semblent plutôt suggérer que l'activation des voies de signalisation intracellulaires par différents facteurs de croissance et récepteurs transmembranaires influenceraient positivement le ER $\alpha$  directement et indirectement, ce qui permettrait la résistance au tamoxifène (Schiff, Massarweh et al. 2003). Les lignées cellulaires développées comme résistantes au tamoxifène exhibent une augmentation de l'activité de la voie des MAP kinases Ras/Raf et de l'expression de certains membres de la famille des récepteurs de croissance épithéliaux (EGFR) (Knowlden, Hutcheson et al. 2003).

## **8.2-Antagonistes du récepteur des estrogènes: Antiestrogènes totaux**

Une seconde classe d'antiestrogènes dénommés antiestrogènes totaux est aussi utilisée dans le traitement de cancers du sein avancés. Cette génération d'antagonistes totaux inhibe toute transactivation par le récepteur des estrogènes (Conzen 2003). Ces composés ont été développés afin de traiter les tumeurs mammaires résistantes au



tamoxifène dans les stades avancés de la maladie. Ces composés ICI 164,384 et ICI 182,780 (Faslodex<sup>™</sup>) sont des antiestrogènes stéroïdiens de la famille des 17 $\alpha$ -alkylamides stéroïdiens. Leur structure moléculaire est similaire à l'estradiol mais avec l'ajout d'une longue chaîne latérale (fig.4). Des essais cliniques démontrent que le faslodex possède une activité anti-tumorale chez les patientes atteintes d'un cancer résistant au tamoxifène (Hanstein, Djahansouzi et al. 2004). Les antiestrogène totaux inhibent le récepteur des estrogènes alpha en prévenant la dimérisation, en empêchant celui-ci de lier l'ADN et en ciblant le récepteur pour qu'il soit dégradé.

### **8.2.1-Mécanismes d'inactivation du ER $\alpha$ par les antiestrogènes totaux**

Tout comme les antiestrogènes partiels, les antiestrogènes totaux (AT) vont modifier l'orientation de l'hélice 12 lorsqu'ils vont se lier au LBD. La longue chaîne latérale des AT sort du LBD et déstabilise l'hélice 12 et la réoriente à une position différente de celle induite par le raloxifène et le tamoxifène. L'hélice 12 ne va pas bloquer le domaine de liaison des coactivateurs mais empêche tout de même l'activation du domaine AF-2 (Pike, Brzozowski et al. 2001).

La conformation forcée adoptée par le ER $\alpha$  lié aux AT cause aussi une diminution dans la demi-vie du récepteur. Les ICI 164,384 et ICI 182,780 confèrent au ER $\alpha$  une conformation tridimensionnelle moins stable et plus sensible aux protéases (Van Den Bemd, Kuiper et al. 1999). Le récepteur se retrouve plus ubiquitiné et dégradé lorsque lié aux ICI 164,384 et ICI 182,780 (Peekhaus, Chang et al. 2004).

### **8.3-Inhibiteurs de l'aromatase**

Les inhibiteurs de l'aromatase (IA) sont une classe de médicaments ayant de plus en plus d'importance dans le traitement du cancer du sein. Ces composés sont des antagonistes sélectifs de l'enzyme aromatase. Cette enzyme catalyse la dernière étape de synthèse des estrogènes. Les IA empêchent la conversion de l'androstèredione en estradiol (Campos 2004). L'utilisation de ces composés peut inhiber de 98% la synthèse d'estradiol (Geisler, King et al. 1996) et permet de créer un environnement sans estrogènes, diminuant la croissance de cellules cancéreuses exprimant le récepteur des estrogènes. Cliniquement, le traitement au inhibiteurs de l'aromatase permet une

régression de cancers du sein de stage avancé résistants au tamoxifène (Buzdar, Jonat et al. 1998; Buzdar, Douma et al. 2001).

### **9-Récepteurs de facteurs de croissance et résistance aux antiestrogènes**

Plusieurs tumeurs ayant acquis une indépendance au tamoxifène surexpriment le récepteur de facteur de croissance épithéliale (EGFR/ErbB1) et/ou le récepteur de facteur de croissance épithéliale 2 (ErbB2/Her2/neu), 2 membres de la famille des EGFR qui semblent fournir des signaux de prolifération et de survie aux tumeurs lorsque le ER $\alpha$  est inactivé par le tamoxifène (Dowsett 2001).

#### **9.1-Rôle potentiel de ErbB2 dans la résistance au tamoxifène**

ErbB2/Her2/neu est un proto-oncogène codant pour une protéine transmembranaire de 185 KDa. ErbB2 est surexprimé dans environ 30% des cancers du sein primaires (Slamon, Godolphin et al. 1989; Clark and McGuire 1991). La surexpression de cet oncogène est fréquemment associé à un faible pronostic de survie, une augmentation de l'agressivité et une augmentation du potentiel métastatique de la tumeur (Press, Bernstein et al. 1997). ErbB2 est un marqueur prédictif d'une faible efficacité du tamoxifène (Ross and Fletcher 1998). Les patientes atteintes de tumeurs surexprimant ErbB2 ont de plus un taux de réponse et une durée d'efficacité du tamoxifène réduite (Kurokawa and Arteaga 2001). Une corrélation négative entre l'expression du ER $\alpha$  et de ErbB2 a été établie. Cependant 50% des tumeurs surexprimant ErbB2 expriment le récepteur des estrogènes formant environ 10% du total des tumeurs mammaires (Dowsett 2001).

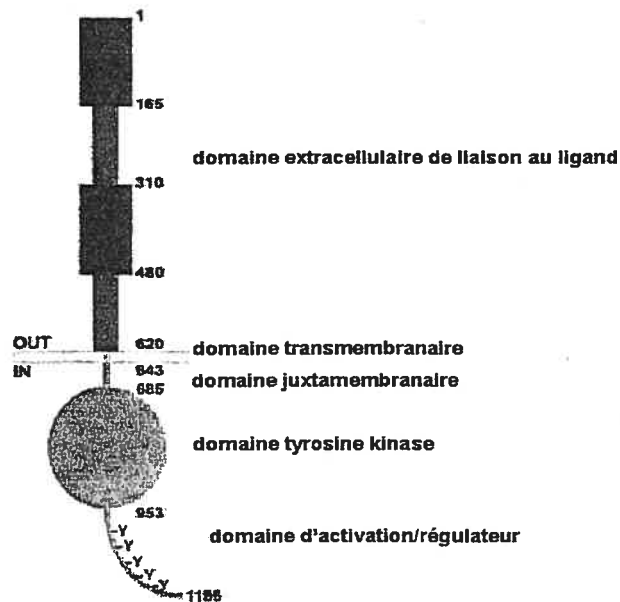
##### **9.1.1-La famille des ErbB**

La famille des récepteurs de facteurs épithéliaux humains (EGFr, Her, ErbB) est une famille de récepteurs tyrosine kinases (RTK) de type I. Cette famille est composée de 4 membres: ErbB1/EGFR, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3 et ErbB4/Her4. Cette famille permet de médier les effets des facteurs de croissance extracellulaires sur la différenciation, la motilité, la survie et la prolifération cellulaire (Marmor, Skaria et al. 2004).

Les membres de la famille des ErbB ont des rôles cruciaux dans le développement de plusieurs tissus. Le phénotype des souris knock-out présentent une létalité embryonnaire précoce lors de la disruption de ErbB2, 3 et 4 et une létalité périnatale pour la disruption de ErbB1 (Burden and Yarden 1997). Les RTK de la famille des ErbB sont aussi requis pour le développement des glandes mammaires lors de la puberté et de la gestation (Stern 2000).

### 9.1.2-Structure des membres de la famille des ErbB

Les 4 récepteurs sont des protéines fortement homologues possédant chacun 5 domaines distincts. Un domaine extracellulaire amino-terminal de liaison aux ligands, un domaine transmembranaire, une région juxtamembranaire, un domaine tyrosine kinase intracellulaire et une région d'activation/régulatrice possédant plusieurs sites de phosphorylation de tyrosines (Burgess, Cho et al. 2003).



**Fig.5 Structure des membres de la famille des Her/ErbB**

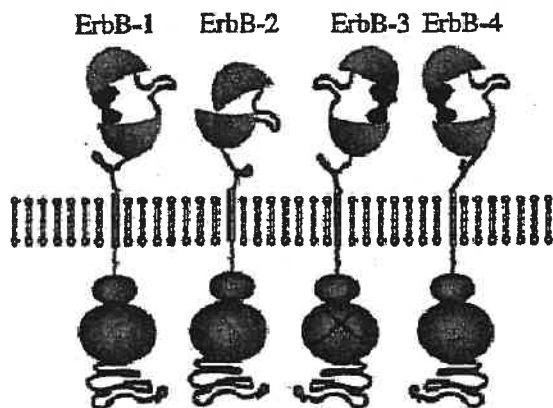
Les 5 domaines d'homologie de la famille des ErbB sont illustrés ainsi que les acides aminés délimitant ces domaines. Modifié à partir de (Burgess, Cho et al. 2003)

### 9.1.3-Activation des membres de la famille des ErbB

Les membres de la famille des Her/ErbB sont activés par la liaison de facteurs de croissance de type EGF par leurs domaines extracellulaires. La liaison du facteur de croissance induit un changement conformationnel dans le domaine extracellulaire de liaison au ligand qui induit l'homo ou l'hétérodimérisation des membres de la famille. Lorsque dimérisés, les récepteurs vont s'autophosphoryler en *trans*. C'est à dire que le domaine tyrosine kinase de chaque monomère va phosphoryler les tyrosines du domaine d'activation/régulateur c-terminal de l'autre monomère. Les phosphotyrosines résultant de cette autophosphorylation recrutent des protéine adaptatrices contenant des domaines SH2 (src homology 2) ou PTB (phosphotyrosine binding) qui, à leur tour activent certaines protéines pouvant moduler diverses voies de signalisation intracellulaires (Schlessinger 2000). ErbB3 ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. À la suite de liaison aux ligands, ErbB3 doit former des hétérodimères pour transmettre les signaux du ligand à la cellule (Guy, Platko et al. 1994).

Une dizaine de ligands existent pour les membres de la famille des ErbB. Ces ligands, comme le EGF, TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha) et les neurégulines, sont des facteurs de croissance ayant une homologie avec EGF. Ces ligands vont lier de manière différente ErbB1, 3 et 4. Chaque ligand à une affinité et une spécificité différente pour les ErbB et peuvent induire différents dimères des ErbB (Hynes, Horsch et al. 2001). Chaque dimère complexé avec différents ligands va avoir un patron de phosphorylation des tyrosines différents en C-terminal. Ces différents patrons vont activer différentes voies de signalisations cellulaires de manière variable.

Les voies Ras-Raf et PI 3-kinase sont les 2 voies de signalisations majeures activées par la famille des ErbB (Herbst 2004).



**Fig.6 Membres de la famille des Her/ErbB**

La famille des Her/ErbB est composée de 4 membres: ErbB1/EGFR, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Ces protéines sont des récepteurs tyrosines kinase de type I ayant la capacité de se dimériser, de s'autophosphoryler et d'activer des voies de signalisation intracellulaires lorsque liés à leurs ligands. ErbB3 ne possède pas d'activité tyrosine kinase et ErbB2 est un récepteur orphelin agissant comme co-récepteur des autres membres de la famille (Marmor, Skaria et al. 2004).

#### **9.1.3.1-ErbB2 est un récepteur orphelin agissant comme co-récepteur des ErbB2**

ErbB2 ne lie aucun des ligands de la famille des EGF. Il a été suggéré que ErbB2 agit en tant que corécepteur pour les membres de la famille des ErbB en état de lier des ligands (Sliwkowski, Lofgren et al. 1999). ErbB2 est le partenaire de dimérisation favori des autres membres de la famille (Graus-Porta, Beerli et al. 1997). Cette préférence est causée par la configuration unique du domaine extracellulaire de ErbB2.

Lors de la liaison au ligand, les domaines extracellulaires des ErbB 1, 3 et 4 changent de configuration. Cette nouvelle conformation permet le relâchement de la boucle de dimérisation vers l'extérieur de la protéine. Cette boucle exposée au milieu extracellulaire est en état d'interagir avec un autre monomère de ErbB, formant un homo- ou un hétérodimère (Ogiso, Ishitani et al. 2002).

ErbB2 adopte une conformation du domaine extracellulaire active constante ressemblant à la conformation des autres membres de la famille des ErbB lorsque associés à leurs ligands. Cette conformation de dimérisation constitutive pourrait expliquer que ErbB2 est le partenaire favori des autres ErbB (Marmor, Skaria et al. 2004). Cette conformation favorable à la dimérisation permet aussi l'autodimérisation et

l'activation indépendante du ligand de ErbB2 (Lonardo, Di Marco et al. 1990; Segatto, Lonardo et al. 1990). Des expériences montrent que la surexpression de ErbB2 dans des cellules NIH 3T3 agit comme oncogène puissant, pouvant transformer les cellules même en absence de ligand (Di Fiore, Pierce et al. 1987; Di Marco, Pierce et al. 1990). La dimérisation forcée de ErbB2 par sa surexpression active donc ErbB2.

## 9.2-Influence de ErbB2 sur l'activité du récepteur des estrogènes alpha

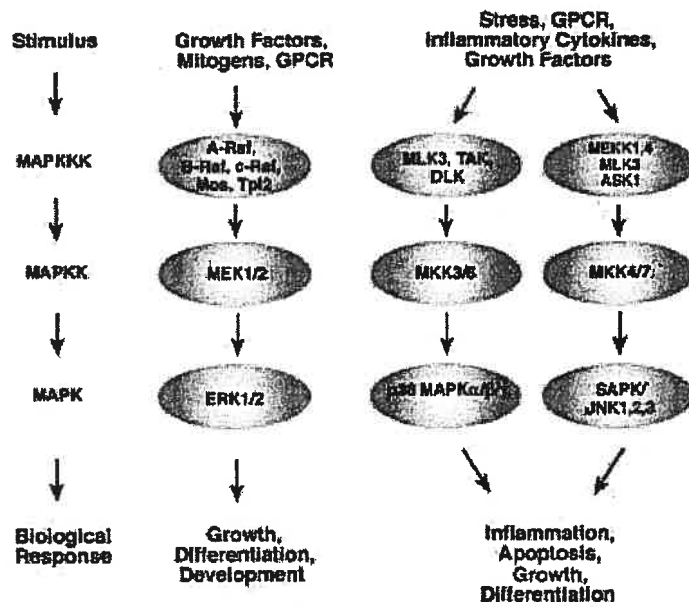
ErbB2 est surexprimé dans 15 à 30% des tumeurs mammaires et participe dans le mécanisme de la résistance au tamoxifène. La surexpression de ErbB2 de manière stable dans les cellules MCF-7 permet aux cellules de croître plus rapidement dans l'agar mou en présence de tamoxifène comparé aux cellules ne surexprimant pas ErbB2 (Kurokawa, Lenferink et al. 2000). Ces cellules (lignée MCF-7/HER2-18) implantées dans des souris de lignée "nude" prolifèrent plus rapidement en présence d'estradiol et en présence de tamoxifène et d'estradiol. Les cellules ne semblent par contre pas pouvoir croître en l'absence d'estrogènes (Benz, Scott et al. 1993). Des données générées à partir d'un autre modèle de cellules MCF-7 transfectées avec ErbB2 démontrent que la surexpression de ErbB2 dans une lignée de carcinome mammaire sensible aux estrogènes confère une indépendance aux hormones *in vitro* (Pietras, Arboleda et al. 1995).

La surexpression de ErbB2 augmente aussi la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle transcriptionnel de ERE en absence d'hormones, en présence d'estradiol ou de tamoxifène (Kurokawa, Lenferink et al. 2000). Cette activation transcriptionnelle de ErbB2 semble être dépendante du domaine AF-1 du ER $\alpha$ . Mutations en alanine des sérines en position 118 et 167 de ER $\alpha$  diminuent les effets positifs de ErbB2 sur la transcription dépendante de ERE. Ces données suggèrent de plus que ErbB2 médierait ses effets transcriptionnels au travers des voies Raf/Erk et PI 3-kinase (Kurokawa and Arteaga 2003). La surexpression de ErbB2 agit aussi sur la transcription de gènes cibles du ER. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine montrent que ER $\alpha$ , AIB1 et p300/CBP sont présents en plus grande proportion sur le promoteur du gène pS2 dans les cellules surexprimant ErbB2 que dans les cellules ne surexprimant pas cet oncogène (Shou, Massarweh et al. 2004).

## 10-Voies des MAP kinases

Les MAP kinases, pour "mitogen activated protein kinase" sont des protéines ayant comme fonction de propager les signaux extracellulaires au cytoplasme et au noyau (Hill and Treisman 1995). Le lien avec l'extérieur de la cellule fournit par les MAP kinases s'effectue par une cascade d'activation. Ces cascades sont composées de l'activation d'une série de kinases qui, à chaque étapes d'activation, vont amplifier les signaux extracellulaires. Cette séquence de kinase débute par la réception d'un signal extracellulaire comme la liaison d'un ligand par un RTK ou un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) ou un stress cellulaire (UV, changement osmotique, etc.) active une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK). Cette MAPKKK va phosphoryler une MAPKK (MAP kinase kinase) qui à son tour va phosphoryler et activer une MAP kinase (MAPK). Cette cascade amplifie le signal à chaque étape d'activation car une seule kinase peut activer plus qu'une molécule cible (Santen, Song et al. 2002).

3 voies de MAP kinases existent chez les mammifères, il s'agit de la voie Raf/Erk MAP kinase, JNK/SAPK MAP kinase et p38 MAP kinase. Ces voies ont des rôles et des modes d'activation différents. Par contre, certains effecteurs spécifiques d'une voie peut être modulée par une autre voie (Santen, Song et al. 2002).



**Fig.7 Cascade d'activation des voies MAP kinases**

La cascade d'activation générale des MAPK est illustrée ainsi que les composantes de chaque étape d'activation des 3 voies MAPK retrouvées chez les mammifères. Figure modifiée à partir de la figure fournie par CellSignal.

### 10.1-Voie des MAP kinases: Raf/Erk

La voie des MAP kinases la mieux caractérisée est la voie menant à l'activation de Erk (extracellular regulated kinase). L'activation de cette voie mène à la différenciation, à la croissance et à la prolifération cellulaire ainsi qu'à l'apoptose (Whitmarsh and Davis 1996). Cette voie est principalement activée par des facteurs de croissance extracellulaires, mais peut être aussi modulée entre autres par les récepteurs couplés aux protéines G, le calcium intracellulaire et les estrogènes. Les facteurs de croissance vont être liés par les parties extracellulaires de récepteurs membranaires de facteurs de croissance de type tyrosine kinase qui vont activer la cascade intracellulaire.

#### 10.1.1- Activation de la voie des MAP kinases par les récepteurs de facteurs de croissance

La liaison de facteurs de croissance extracellulaires tel EGF par un RTK comme EGFR/ErbB1 induit la dimérisation du récepteur. Cette dimérisation permet l'autophosphorylation des tyrosines de la région c-terminale intracellulaire du récepteur.

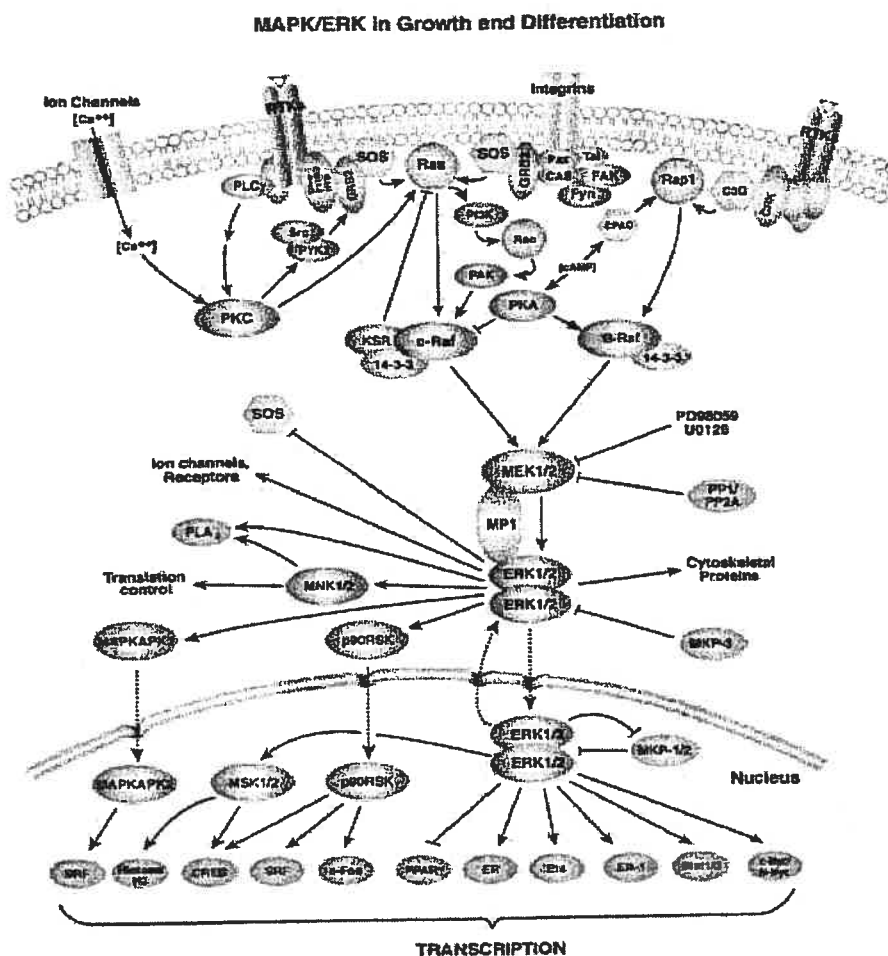


Ces tyrosines phosphorylées deviennent des sites d'ancrage pour différentes protéines contenant des domaines SH2 ou PTB pouvant reconnaître et lier diverses phosphotyrosines. Ces protéines, comme Shc, sont des protéines adaptatrices ayant plusieurs sites d'interaction protéine-protéine. Le recrutement de Shc au RTK induit sa phosphorylation par le domaine kinase du récepteur ce qui crée un autre site d'ancrage à une autre protéine adaptatrice nommée Grb2. Grb2 a comme fonction d'amener SOS (Son of Sevenless) à la membrane plasmique. Une fois localisé à la membrane, ce facteur d'échange de guanine (GEF) lie la protéine Ras. Ras est une petite GTPase de 21 KDa. Lorsque Ras est lié au GDP, la protéine est inactive tandis que la liaison de GTP active Ras. L'activité catalytique de Ras converti le GTP lié en GDP et inactive la protéine. SOS est une GEF faisant la promotion de l'échange du GDP lié à Ras contre une molécule de GTP afin d'activer Ras. Ras actif interagit avec Raf. Lorsque Ras est inactif, le domaine kinase de Raf est inhibé par son interaction avec une autre partie de cette même protéine (Cutler, Stephens et al. 1998). L'interaction de Ras-GTP avec Raf permet la libération du domaine kinase de Raf, ce qui active la protéine (Cutler, Stephens et al. 1998; Dhillon and Kolch 2002). Raf est la MAPKKK de la voie Raf/Erk. Raf phosphoryle et active les MAPKK Mek 1 et 2 qui vont à leur tour phosphoryler les MAPK Erk1 et 2. Ces MAP kinases sont maintenant dans la possibilité d'aller phosphoryler diverses cibles de la voie Raf/Erk contenant le motif de phosphorylation consensus  $PX_nS/TP$  (Gonzalez, Raden et al. 1991). Erk1/2 activent  $pp90^{RSK1}$ , une autre kinase ayant des rôles dans la croissance et la prolifération. Ces MAPK sont aussi transloquées au noyau après activation. Cette translocation permet à Erk1/2 de phosphoryler plusieurs facteurs de transcription tel Elk1, cMyc, ER $\alpha$ , Ets1, etc. (Santen, Song et al. 2002; Zhang and Liu 2002).

### **10.1.2-Rôle de la voie Raf/Erk MAPkinase dans la prolifération cellulaire**

LA voie des MAP kinases Raf/Erk a un rôle important à jouer dans la croissance et la prolifération cellulaire. L'activation de Erk est considérée comme un point de vérification pour la mitogénèse cellulaire (Zhang and Liu 2002) et l'activation biphasique de cette voie en G1 corrèle avec l'entrée des cellules en phase S (Tamemoto, Kadowaki et al. 1992). La voie Erk exerce plusieurs effets sur la prolifération cellulaire.

Premièrement, la voie Erk active AP-1 en augmentant la transcription de la sous unité c-Fos de ce facteur de transcription. La transcription de c-Fos est augmentée par la phosphorylation de Elk-1 par Erk. Elk-1 est un facteur de transcription pouvant interagir avec le promoteur du gène c-Fos et activer son expression (Marais, Wynne et al. 1993). AP-1 contrôle l'expression de plusieurs gènes important dans la prolifération cellulaire dont cMyc et Cycline D1. La cycline D1 a un rôle important dans la transition G1/S car en complexe avec Cdk4/6, elle permet la phosphorylation de Rb et la libération de E2F, un facteur de transcription activant l'expression de gènes requis pour la transition G1/S (Leone, DeGregori et al. 1997). Erk peut aussi agir au niveau de la protéine p27<sup>KIP1</sup>. Cette protéine lie cycline E/Cdk2 et forme un complexe inactif avec ces facteurs, bloquant la transition G1/S. Erk phosphoryle p27<sup>KIP1</sup> ce qui cible la protéine au proteasome pour être dégradée (Zhang and Liu 2002).



**Fig.8 Voie des MAPkinases Raf/Erk**

Les multiples mécanismes d'activation de la voie Raf/Erk MAPK est illustré ainsi que les diverses cibles de cette voie. Figure modifiée à partir de la figure fournie par CellSignal.

### 10.2-Voie des MAP kinases: JNK

La voie des MAP kinases JNK est activée par différents stress cellulaires comme les radiations, l'inhibition de la synthèse protéique et certaines cytokines (Derijard, Hibi et al. 1994; Galcheva-Gargova, Derijard et al. 1994; Sluss, Barrett et al. 1994). Ces stress activent la MAPKKK Mekk1 qui phosphoryle et active MKK4 qui a sont tour va activer la MAP kinase JNK (Jun N-terminal kinase). JNK a plusieurs cibles tel c-Jun, ATF2 et Elk1. JNK peut activer AP-1 de manière transcriptionnelle au travers de Elk1

qui active la transcription de c-Fos et ATF2 qui active la transcription de c-Jun ou en phosphorylant directement c-Jun. Les effets de la voie JNK ne sont pas très caractérisés, mais il est connu que cette voie a un rôle dual de mitogénèse et d'activation de l'apoptose (Pedram, Razandi et al. 1998; Tournier, Hess et al. 2000).

### **10.3-Voie des MAP kinases: p38**

La voie des MAP kinases p38 est activée par différents stimuli incluant différentes hormones, ligands de GPCR et des stress cellulaires comme des choc thermiques ou osmotiques (Johnson and Lapadat 2002). p38 a un rôle important dans la réponse immunitaire car l'activation de cette voie active l'expression de différentes cytokines inflammatoires (Lee, Laydon et al. 1994). De plus, p38 peut influencer négativement le cycle cellulaire (Lee, Laydon et al. 1994).

### **11-Voie de la PI 3-kinase**

La voie de la kinase du phosphatidylinositol 3 (PI 3-kinase) est une autre voie de signalisation intracellulaire pouvant être activée par ErbB2. Cette voie a des effets sur le développement, la différenciation et la prolifération cellulaire (Fresno Vara, Casado et al. 2004). La voie de la PI 3-kinase médie ce effets prolifératifs et antiapoptotiques au travers de la kinase effectrice Akt (Testa and Bellacosa 2001).

#### **11.1-Activation de la voie de la PI 3-kinase**

La PI 3-kinase est une kinase pouvant phosphoryler certains types de lipides. Cette kinase est constituée de 2 sous unités: Une sous unité catalytique de 100 KDa (p110) et une sous unité adaptatrice/régulatrice de 85kDa (p85). Cette sous unité est recrutée par les récepteurs de facteurs de croissance ou par des GPCR. Cette interaction avec les RTK s'effectue par l'association de domaines SH2 de p85 aux phosphotyrosines de la région C-terminale du récepteur. Cette association mène à l'activation allostérique de la sous unité catalytique (Hunter 2000). La sous unité p110 active peut alors catalyser la phosphorylation de phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), une lipide de la membrane plasmique, en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>). PIP<sub>3</sub> recrute ensuite des protéine ayant des domaines d'interaction aux lipides de type PH (pleckstrin

homology) à la membrane plasmique comme la kinases dépendante de  $PIP_3$  (PDK1) et Akt. L'activité de PDK1 est induite lorsque la protéine est recrutée à la membrane. Lorsque Akt est recruté à la membrane par son domaine PH, PDK1 phosphoryle cette protéine sur la thréonine en position 308 (Alessi, Andjelkovic et al. 1996). Cette phosphorylation amène l'activation de Akt (Fresno Vara, Casado et al. 2004).

## **11.2-Modulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire par Akt**

Akt possède plusieurs substrats associés à la régulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire. Les effets de Akt sur ces voies se passe par l'entremise de son activité sérine/thréonine kinase. Akt reconnaît et phosphoryle les motifs ayant comme séquence consensus RxRxxS/T (Brunet, Bonni et al. 1999).

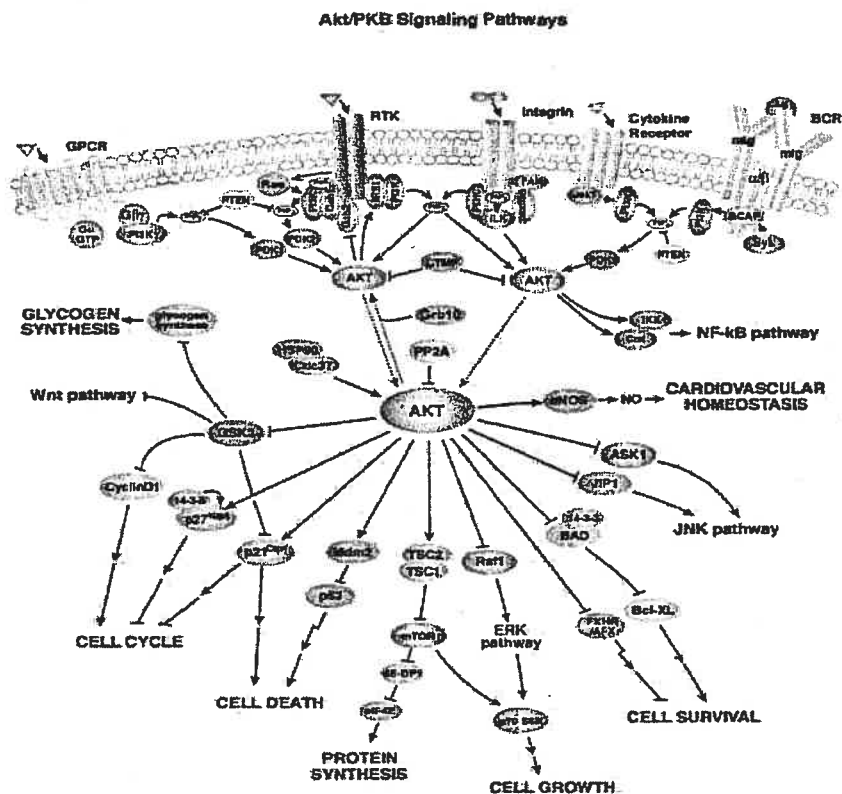
### **11.2.1-Modulation de l'apoptose par Akt**

Akt induit la survie cellulaire par différents mécanismes. Akt peut phosphoryler et inactiver certains facteurs pro-apoptotiques comme Bad et procaspase-9. La kinase Akt a de plus la propriété d'être transloquée au noyau lorsque activée. Cette localisation nucléaire permet à la kinase de phosphoryler et d'inhiber la famille des facteurs de transcription forkhead qui peuvent activer la transcription de gènes pro-apoptotiques (Brunet, Bonni et al. 1999).

### **11.2.2-Modulation de la prolifération cellulaire par Akt**

Akt influence l'activité de la cycline D1 qui a un grand rôle à jouer dans la progression G1/S en phosphorylant la kinase de la glycogène-synthase 3 (GSK3) ce qui cause son exportation du noyau. GSK3 influence négativement l'activité de la cycline D1 à 2 niveaux. Premièrement GSK3 induit la dégradation de la  $\beta$ -caténine en la phosphorylant. La  $\beta$ -caténine a la capacité d'activer les facteurs de transcription TCF/LEF-1 qui peuvent induire l'expression de la cycline D1. GSK3 peut deuxièmement phosphoryler cycline D1 et induire sa dégradation. L'inhibition de GSK3 par Akt permet donc une augmentation et une stabilisation des niveaux de cycline D1 (Fresno Vara, Casado et al. 2004). De plus, tout comme Erk, Akt peut phosphoryler

p27<sup>Kip1</sup>. Cette phosphorylation mène à l'exportation de p27<sup>Kip1</sup> du noyau et l'inhibition de son activité antiproliférative (Viglietto, Motti et al. 2002).



**Fig. 9** Voie de la PI 3-kinase

Illustration des divers modes d'activation de la voie PI 3-kinase et des multiples cibles de cette voie de signalisation intracellulaire. Figure modifiée à partir de la figure fournie par CellSignal.

**Chapitre II: OBJECTIFS**

La surexpression de l'oncogène ErbB2/Her2 dans les tumeurs mammaires est associée à un faible pronostic de survie, une augmentation de l'agressivité et du potentiel métastatique de la tumeur ainsi qu'à la résistance à l'antiestrogène partiel tamoxifène.

Il a été démontré que la surexpression de ErbB2 dans des cellules de carcinomes mammaires conférait à ces cellules un avantage de survie en présence de tamoxifène. Il a aussi été démontré que la surexpression de ErbB2 augmentait la transcription de gènes cibles du récepteur des estrogènes sous le contrôle de ERE. La plupart des données disponibles sur les effets de la surexpression de ErbB2 dans les carcinomes mammaires humains ont été obtenues à partir du modèle cellulaire MCF-7/HER2-18 (Benz, Scott et al. 1993). Ce modèle a été généré en sélectionnant parmi une population de cellules transfectées avec l'ADNc de ErbB2 un clone exprimant fortement cet oncogène.

La lignée cellulaire MCF-7/HER2-18 étant une lignée clonale, serait-il possible que les effets sur le récepteur des estrogènes et la prolifération cellulaire ne soit pas due à la présence de ErbB2 mais serait causée par un artéfact de sélection?

Peu de données sont disponibles sur l'influence de la surexpression de ErbB2 sur la prolifération cellulaire et la transcription de gènes cibles du ER en présence d'antiestrogènes totaux comme faslodex<sup>tm</sup>. De plus, les études sur l'influence de la surexpression de ErbB2 sur la fonction transcriptionnelle de ER se limitent à l'étude de gènes sous le contrôle d'éléments de réponse classiques et peu de choses sont connues sur l'influence de ErbB2 sur la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'éléments de réponse aux estrogènes non-classiques tel ERE/Sp1 ou AP-1.

La surexpression de ErbB2 pourrait-elle influencer la prolifération cellulaire en présence d'antiestrogènes totaux de la même manière qu'elle influence la prolifération en présence de tamoxifène? ErbB2 pourrait-il activer la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'éléments de réponse aux estrogènes non-classiques? Et par quels mécanismes ErbB2 influence-t-il la fonction du récepteur des estrogènes?

Afin de répondre à ces questions, nous allons tout d'abord générer une population de cellules de carcinomes mammaires MCF-7 surexprimant l'oncogène ErbB2. Nous étudierons l'influence de ErbB2 sur la prolifération cellulaire modulée par les estrogènes, l'antiestrogène partiel tamoxifène et l'antiestrogène total ICI 182,780. Nous nous pencherons aussi sur l'effet de la surexpression de ErbB2 sur l'expression des gènes



cibles pS2, PR et cMyc qui sont sous le contrôle transcriptionnel de différents éléments de réponse aux estrogènes (ERE, ERE/SP1 et AP-1 respectivement). Notre but est de confirmer les données générées à partir du modèle MCF-7/HER2-18 et de déterminer les effets potentiels que ErbB2 peut avoir sur l'influence de la transcription sous le contrôle d'éléments de réponse aux estrogènes non-classiques et sur la fonction du récepteur des estrogènes en présence de ICI.

Nous essaierons ensuite de déterminer par quelles voies de signalisation intracellulaire ErbB2 médie ces effets. Pour ce faire nous allons utiliser en parallèle à la population de cellules surexprimant ErbB2 une lignée cellulaire exprimant la forme constitutivement active de ras. La comparaison des patrons de prolifération et d'expression génique nous permettra de déterminer si la voie Ras/Raf MAP kinase a un rôle à jouer dans l'influence qu'exerce ErbB2 sur la prolifération et l'expression génique dépendante des estrogènes. Nous utiliserons de plus divers inhibiteurs de voies de signalisation intracellulaire afin de déterminer laquelle de ces voies est essentielle pour la médiation des effets de ErbB2.

### **Chapitre III: MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1-Culture cellulaire**

### **1.1-Génération des lignées AP2 et ErbB2**

Les lignées cellulaires AP2 et ErbB2 ont été générées en infectant des cellules MCF-7 avec le vecteur AP2 vide ou contenant le cDNA de HER2/ErbB2 empaqueté dans un virus de stomatitis vésiculaire recombinant de pseudotype G. La production de virus et l'infection a été exécuté selon la manière décrite en (Galipeau, Li et al. 1999). Le vecteur AP2 permet l'expression de gènes clonés dans ce vecteur simultanément avec le gène de la protéine fluorescente verte (GFP). Les populations ont été enrichies de cellules infectées en sélectionnant les cellules exprimant la GFP par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Le seuil d'intensité minimal sous lequel les cellules ne seraient pas sélectionnées a été déterminé en mesurant la fluorescence de cellules MCF-7 non-infectées. Les cellules infectées ont ensuite été soumises à la sélection par FACS. Deux rondes de FACS ont permis l'enrichissement de la lignée AP2 à 88,5% de cellules infectées et trois rondes de FACS ont permis l'enrichissement de la lignée ErbB2 à 83,6% de cellules infectées.

#### **1.2.1-Cellules MCF-7**

Les cellules MCF-7 sont des cellules de carcinome mammaire exprimant le récepteur des estrogènes alpha. Ces cellules sont cultivées dans le milieu  $\alpha$ MEM (Modified Eagle's Medium) complété avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) ainsi que 1% de pénicilline et de streptomycine (Wisent) et 1% de Sodium Pyruvate dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> gardée à 37°C. Les cellules sont diluées deux fois par semaine au 1/3<sup>ième</sup>.

#### **1.2.2-Cellules ErbB2 et AP2**

La lignée cellulaire ErbB2 est une population de cellules MCF-7 surexprimant l'oncogène ErbB2. Cette population a été générée par infection rétrovirale d'un vecteur AP2 contenant le cDNA pour ErbB2 empaquetée dans un virus de stomatitis vésiculaire recombinant de pseudotype G. La lignée AP2 a été généré de même manière, mais avec le vecteur AP2 vide ne contenant pas le cDNA de ErbB2. Ces cellules sont cultivées

dans le milieu  $\alpha$ MEM (Modified Eagle's Medium) complété avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) ainsi que 1% de pénicilline et de streptomycine (Wisent) et 1% de Sodium Pyruvate dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> gardée à 37°C. Les cellules sont diluées deux fois par semaine au 1/3<sup>ième</sup>.

### 1.2.3-Cellules RasV12 et pBabe

La lignée cellulaire RasV12 est une lignée de cellules MCF-7 surexprimant la forme activée de h-ras : rasV12. Cette lignée ainsi que la lignée pBabe a été générée à partir de cellules MCF-7 infectées avec le vecteur pBabe contenant le cDNA de RasV12 (lignée RasV12) ou le vecteur pBabe (lignée contrôle pBabe) par un rétrovirus de la manière décrite en (Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000). Ces cellules sont cultivées dans le milieu  $\alpha$ MEM (Modified Eagle's Medium) complété avec 10% de sérum foetal bovin (FBS) ainsi que 1% de pénicilline et de streptomycine et 1% de Sodium Pyruvate (Wisent) dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> gardée à 37°C. Les cellules sont diluées deux fois par semaine au 1/3<sup>ième</sup>.

### 1.2.4-Cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 sont des cellules épithéliales de reins humains immortalisées. Ces cellules sont cultivées dans le milieu DMEM (Dulbeccio's Modified Eagle's Medium) complété avec 5% de sérum foetal bovin (FBS) ainsi que 1% de pénicilline et de streptomycine (Wisent) et 1% de Sodium Pyruvate dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> gardée à 37°C. Les cellules sont diluées deux fois par semaine au 1/10<sup>ième</sup>.

### 1.3-Transfection des cellules

Les cellules HEK293 sont cultivées dans du milieu DMEM dépourvue de rouge de phénol (milieu blanc) complémenté de 5% FBS traité au charbon actif (FBST), 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine (Wisent) deux jours avant la transfection. 1 million de cellules HEK 293 sont distribués également dans les compartiments des plaques à 6 puits (starstetd) (~16'700 cellules/puits). 18 heures plus tard les cellules sont transfectées avec 15 $\mu$ g d'ADN

plasmidique par plaque de 6 puits par précipitation par calcium phosphate. L'ADN est mise en solution dans 500 $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 125mM. Le précipité est formé en ajoutant cette solution à 500 $\mu$ L de HBS (HEPES 50mM, KCl 10mM, Glucose 12mM, NaCl 280mM et Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5mM avec un pH final de 7,15). Le précipité de 1mL est distribué dans les 6 puits de manière égale (166 $\mu$ l/puits) et les cellules sont remises en culture pour environ 16 heures. Après cette période le surnageant est aspiré et les cellules sont rincées deux fois avec 1mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite remises 30 minutes en culture dans du milieu DMEM blanc ne contenant pas de sérum. Le surnageant est ensuite aspiré et les cellules sont remises en culture pour 24 heures dans du milieu DMEM blanc sans sérum complétement de 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine. Les cellules sont ensuite traitées pendant 48h heures avec 0,1% EtOH, 2,5x10<sup>-8</sup>M 17 $\beta$ -estradiol (SIGMA), 1x10<sup>-6</sup>M tamoxifène (SIGMA) ou 1x10<sup>-7</sup>M ICI 182,780 (SIGMA) en solution dans de l'éthanol 100%

#### **1.4-Essais de prolifération cellulaire par dosage protéines**

Les cellules MCF-7, AP2, ErbB2, pBabe et RasV12 sont cultivées dans du milieu DMEM dépourvue de rouge de phénol (milieu blanc) complétement de 10% FBS traité au charbon actif (FBST), 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine deux jours avant l'expérience. 180'000 cellules sont ensuite distribuées dans des plaques à 6 puits (30'000 cellules par puits) et cultivées dans du milieu DMEM dépourvue de rouge de phénol (milieu blanc) complétement de 10% FBS traité au charbon actif (FBST), 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% pendant 4 heures. Le surnageant est ensuite aspiré et les cellules sont rincées 2 fois avec 1mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite cultivées 18 heures dans du milieu DMEM blanc ne contenant pas de sérum complétement avec 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu DMEM blanc contenant 5% de FBST et 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine. Les cellules sont ensuite traitées en ajoutant 0,1% EtOH, 1x10<sup>-7</sup>M 17 $\beta$ -estradiol (SIGMA), 1x10<sup>-6</sup>M tamoxifène (SIGMA) ou 1x10<sup>-7</sup>M ICI 182,780 (SIGMA) en solution dans de l'éthanol 100% au milieu. Les cellules sont traitées pendant 4 jours et le milieu avec

traitement changé après 48h. Après 48h, le milieu est aspiré et les cellules rincées 2 fois avec du PBS 1X. Les cellules sont lysées avec 500 $\mu$ L de NaOH 0,1N par puits et incubé 15 minutes à température de la pièce. Les protéines cellulaires sont ensuite dosées par quantification colorimétrique utilisant le test modifié de Lowry (BIORAD).

## **2-Essais luciférase**

### **2.1-Transfection**

Les cellules HEK 293 ont été transfectées et traitées tel que décrit dans la section 1.2. Les cellules ont été transfectées avec 2  $\mu$ g du vecteur ERE3-TATA-LUC, 0,5  $\mu$ g de pCMV- $\beta$ Gal, 2  $\mu$ g de pSG5-HEG0, 9 $\mu$ g de pEV7-HER2 ou de pEV7 vide et 1,5  $\mu$ g d'ADN plasmidique BSM.

### **2.2-Extraction et réaction enzymatique**

Le surnageant des cellules est aspiré et les cellules rincées 2 fois au PBS 1X. Les protéines sont extraites en ajoutant 200 $\mu$ L de tampon de lyse (TRIS 200mM pH 7,9, NP-40 1%, dithiothreitol(DTT) 1mM) par puits et en incubant 5 minutes à température de la pièce. 10 à 100  $\mu$ L d'extrait cellulaire sont ajoutés au tampon luciférine (D-luciférine 1mM, ATP 4mM, MgCl<sub>2</sub> 0,4mM, Coenzyme A 10mM, dans le tampon Tris 100mM pH 7,9) dans des plaques de plastique transparentes à 96 puits. La luminescence a été mesurée en utilisant l'appareil Fusion  $\alpha$ -FP de Packard.

## **3-Essais Chloramphénicol Acétyl-Transférase (CAT)**

### **3.1-Transfection**

Les cellules HEK 293 ont été transfectées et traitées tel que décrit dans la section 1.2. Les cellules ont été transfectées avec 2  $\mu$ g du vecteur AP1<sub>6</sub>-Ebv-CAT, 0,5  $\mu$ g de pCMV- $\beta$ Gal, 2  $\mu$ g de pSG5-HEG0 ou de pSg5, 9 $\mu$ g de pEV7-HER2 ou de pEV7 vide et 1,5  $\mu$ g d'ADN plasmidique BSM.

### 3.2-Extraction et réaction enzymatique

Le surnageant des cellules et aspiré et les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS 1X. 200 $\mu$ L de Tris 0,25M pH 8.0 est ajouté dans chaque puits et soumis à 3 cycles de gels sur glace sèche pendant 10 minutes et dégel à température ambiante. 10 à 50  $\mu$ L d'extrait sont dilués à 125 $\mu$ L final en ajoutant du Tris 0,25M pH 8.0, 0,25  $\mu$ Ci de Chloramphénicol  $^3$ H (Perkin-Elmer) et 25  $\mu$ g de n-butyryl CoA (SIGMA). 300 $\mu$ L de xylène est ajouté après 1h d'incubation à 37°C. La phase organique est clarifiée par centrifugation et extraite pour ensuite être lavée 3 fois avec 100  $\mu$ L de Tris 0,25M pH 8,0. 200  $\mu$ L de la phase organique sont ensuite transféré dans des fioles à scintillation contenant 10mL de scintillant Universol (ICN) et les comptes de radioactivité lus.

### 4-Essais $\beta$ Galactosidase

L'efficacité des transfection est standardisée grâce au contrôle interne  $\beta$  galactosidase. Les niveaux d'activité luciférase et chloramphénicol acétyl-transférase sont normalisés à partir de ce test. 10  $\mu$ L d'extraits cellulaires obtenus avec le tampon de lyse des essais luciférase ou CAT sont ajouté à 148  $\mu$ L de tampon Z (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40mM, KCl 10mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM, b-mercaptoéthanol 50mM) et 32  $\mu$ L d'une solution de B D-galacto-pyranoside (ONPG) 4 g/L dilué dans le tampon Z. L'activité  $\beta$ -galactosidase est mesurée par dosage colorimétrique à l'aide de l'appareil SpectroMax 160 de Molecular Devices.

### 5-Immunobuvardage de type Western Blot

Des cellules MCF-7 ont été infectées avec un rétrovirus contenant le vecteur AP2 vide (AP2) ou le vecteur AP2 contenant le cDNA de l'oncogène ErbB2 (ErbB2). Après infection, les populations ont été enrichies de cellules infectées en sélectionnant les cellules exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) codée dans le vecteur AP2 par FACS (fluorescence activated cell sorting). Les cellules MCF-7 non-infectées ont été utilisées afin de déterminer le seuil minimal de fluorescence requise pour la sélection de cellules "positives".

### 5.1-Extraction des protéines

4 à 5 millions de cellules AP2, ErbB2, pBabe et RasV12 ont été cultivées 2 jours dans du milieu DMEM sans rouge de phénol ne contenant pas de sérum dans des pétris de 10cm. Le surnageant est aspiré et les cellules rincées 2 fois avec du PBS 1X froid. 500  $\mu$ L de PBS 1x est ensuite ajouté dans chaque pétri et les cellules sont récoltées à l'aide d'un patin de caoutchouc. Les cellules sont ensuite centrifugées à 3'500 RPM pour 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et 100  $\mu$ L de tampon de lyse est ajouté (KCl 400mM, Tris 20mM pH 7,5, DTT 2mM, glycérol 20%, PMSF 0,18 $\mu$ g/ml, pepstatine 1 $\mu$ g/ml, aprotinine 2 $\mu$ g/ml, leupeptine 2 $\mu$ g/ml, NaF 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM). Les extraits sont soumis à 3 cycles de gels sur glace carbonique pendant 5 minutes et dégel sur glace. Les extraits sont ensuite centrifugés à 10'000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. 5  $\mu$ L de surnageant est dosé par méthode micro BCA (bicinchoninic acid) pour déterminer la quantité de protéines dans chaque extraits.

### 5.2-Électrophorèse des protéines

40 à 60  $\mu$ g de protéines est resuspendu dans un volume approprié de tampon de chargement (Tris 200mM pH 6,8, b-mercaptoéthanol 1,5M, SDS (sodium dodécyl sulfate) 2%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,015%). Les extraits sont dénaturés à 95°C pendant 10 minutes et ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide (entre 7,5% et 12% selon le poids moléculaire de protéines étudiées) dénaturant. La migration des protéines est effectuée à 120V en utilisant un appareil électrophorétique Mini-Protean II de Biorad. Les protéines restent en migration jusqu'à la sortie du bleu de bromophénol.

### 5.3-Transfert des protéines sur membranes

Une membrane Hybond-P de Amersham de PVDF (polyvylidene difluoride) de 10,5 x 6,5 cm est immergée 20 secondes dans 10 mL de méthanol, rincée 2 minutes dans 10ml d'eau et ensuite dans 10 ml de solution de transfert (Tris 25mM, glycine 150mM, méthanol 15%). Le transfert est effectué en milieu humide dans une cuve électrophorétique Biorad utilisant le tampon de transfert décrit précédemment. Le gel de protéines est déposé sur la membrane préalablement équilibrée se retrouvant du côté de la cathode. Le gel et la membrane sont flanqués par (allant de l'intérieur vers l'extérieur)



un rectangle de papier watman et une mousse absorbante de dimension 12 x 7,5 cm préalablement humidifiée avec le tampon de transfert. Le transfert est effectué à 100 volts pendant 60 minutes.

#### 5.4-Immuno-buvardage de type western blot

La membrane est mise dans un tampon Tris-salin (TBS) (Tris 10mM, NaCl 150mM, 5mM KCl, à pH 7,4) contenant 0,1% de tween (TBST) pendant 5 minutes. La membrane est ensuite bloquée dans une solution de 5% de lait déshydraté solubilisé dans du TBST pendant 1 heure à température de la pièce ou une nuit à 4°C. Les membranes bloquées sont rincées 2 fois avec 10 mL de TBST et incubés 2 heures à température de la pièce avec leurs anticorps primaires. Les anticorps utilisés ont été : anti-phospho-ErbB2 (anticorps polyclonal de lapin, UBS), anti-ErbB2 (anticorps polyclonal de lapin, UBS), anti Ras (anticorps polyclonal de lapin, CellSignal), anti-phospho p42/p44 MAPK (Thr202/Tyr204, anticorps monoclonal de souris, CellSignal), anti-p42/p44 MAPK (anticorps polyclonal de lapin, CellSignal), anti-phospho-Akt (Ser473, anticorps monoclonal de souris, CellSignal), anti-phospho ER $\alpha$  ser118 (anticorps monoclonal de souris, CellSignal), anti-ER $\alpha$  (anticorps monoclonal de souris, CellSignal) et anti- $\beta$ Actine (anticorps monoclonal de souris, Sigma). Les concentrations d'anticorps utilisées sont celles recommandées par le manufacturier.

La membrane est ensuite rincée 3 fois 20 minutes avec 15 mL de TBST à la température de la pièce. Le second marquage s'effectue avec 10ml d'anticorps secondaire (anti lapin ou souris, CellSignal, 1 dans 2000 dilué dans TBST 0,5% lait déshydraté) ajouté à la membrane qui est incubée 1 heure à température de la pièce. La membrane est ensuite rincée 3 fois 20 minutes avec 15 mL de TBST à la température de la pièce. Le marquage est ensuite révélé par luminescence en utilisant la trousse de réactifs ECL (Perkin Elmer) et en exposant sur un film « hyperfilm » de Amersham biosciences.

Les anticorps liés à la membrane peuvent être élués en utilisant un tampon de « stripping » ( $\beta$ -mercaptoéthanol 0,01%, SDS 2%, Tris 0,625 M pH 6,7 )et ensuite être re-bloquées et re-marquées.

## **6-PCR en temps réel de banques d'ADNc**

### **6.1-Traitement de cellules pour expériences de PCR en temps réel**

Les cellules MCF-7, AP2, ErbB2, pBabe et RasV12 sont cultivées dans du milieu DMEM blanc complété de 10% FBS traité au charbon actif (FBST), 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine deux jours avant l'expérience. 3 millions de cellules sont mises en culture dans des pétri de 10cm (starstedt) dans 5 mL de DMEM blanc complété de 10% FBST 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de Sodium Pyruvate et 1% de glutamine pour 4 heures. Le surnageant est ensuite aspiré et les cellules rincées 2 fois avec 2,5mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite remises en culture dans du milieu DMEM blanc sans sérum avec 1% de pénicilline et de streptomycine, 1% de sodium pyruvate et 1% de glutamine contenant ou ne contenant pas 10 $\mu$ M de l'inhibiteur de MEK U0126 (NEB Cell Signal) pendant 18 heures. Les cellules sont ensuite mises en culture avec du milieu DMEM blanc sans sérum contenant 0,1% EtOH, 2,5x10<sup>-8</sup>M 17 $\beta$ -estradiol (SIGMA), 1x10<sup>-6</sup>M tamoxifène (SIGMA) ou 1x10<sup>-7</sup>M ICI 182,780 (SIGMA) avec ou sans 10 $\mu$ M de U0126 en solution dans de l'éthanol 100%.

### **6.2-Extraction de l'ARN**

Les cellules sont lysées en utilisant 1 ml de TRIzol<sup>™</sup> (Gibco) et nous utilisons le "TRIzol RNA extraction protocol" de la compagnie GIBCO pour extraire l'ARN. L'ARN extraite est resuspendue dans 50  $\mu$ L d'eau millipore sans RNase et est ensuite dosée par densité optique à l'aide de l'appareil SpectroMax 160 de Molecular Devices.

### **6.3-Réaction de transcriptase reverse**

La génération d'ADNc à partir de nos extraits d'ARN est effectuée en utilisant la trousse de réaction de transcription reverse "RevertAid H minus direct strand cDNA synthesis kit" de Fermentas utilisant la reverse transcriptase M-MuLV. 2  $\mu$ g d'ARN sont utilisés dans chaque réactions et nous utilisons des oligo(dT)<sub>18</sub> comme amorces afin de ne synthétiser que des ADN complémentaires à des ARN messagers. La réaction finale de 20  $\mu$ L est diluée 10 fois dans l'eau millipore pour faire une solution stock de 200  $\mu$ L.

## 6.4-PCR en temps réel

### 6.4.1-Amorces

4 gènes sont étudiés dans ce projet de recherche: pS2, PR, cMyc et p36B4. Les amorces ont été dessinées en utilisant le logiciel Internet Primer 3 [[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)]. Les amorces ont été dessinées pour que leur taille soit entre 20 et 27 nucléotides avec une taille optimale de 22 et une température de fusion entre 60 et 70°C. Les séquences des amorces sont:

pS2 Gauche:	ACCATGGAGAACAAGGTGAT
pS2 Droite:	AAATTCACACTCCTCTTCTG
PR Gauche:	CAATGGAAGGGCAGCACAATA
PR Droite:	CTCTGGCTTAGGGCTTGGCTTT
cMyc Gauche:	CAGAGAAGCTGGCCTCCTACCA
cMyc Droite:	CAGAGAATCCGAGGACGGAGAG
p36B4 Gauche:	TGAAGTCACTGTGCCAGCCCA
p36B4 Droite:	AGAAGGGGGAGATGTTGAGCA

### 6.4.2-Mélange réactionnel

2µL de la réaction de transcription reverse diluée sont utilisés par réactions de PCR. L'ADN est amplifié avec l'enzyme "Jump Start Taq DNA polymerase" de Sigma. Le mélange réactionnel contient le tampon "Jump Start", la polymérase d'ADN Taq, 0,625X de la solution stock 10'000 X de SybrGreen (MolecularProbe), 0,4mM d'ATP, de CTP, de GTP et de TTP, entre 3,5 et 4,5mM de MgCl<sub>2</sub> et entre 200 et 350 nM d'amorces selon le gène amplifié. Le volume final de réaction est de 25 µL et est complété avec de l'eau millipore.

L'amplification du gène cMyc est optimale lorsque 200 nM d'amorce est utilisée tandis que l'amplification de pS2, PR et p36B4 est optimale lorsque la concentration d'amorces est de 350 nM. La concentration idéale de MgCL<sub>2</sub> pour l'amplification de cMyc et de PR est de 3,5 mM tandis qu'elle est de 4,0 mM pour pS2 et p36B4.

### 6.4.2-Cycles de PCR et lecture de la fluorescence

Le programme de PCR effectue une étape d'amorce de la réaction suivie de 50 cycles d'amplification et d'une étape de validation des produits d'amplification. La

première étape est une étape de dénaturation et d'activation. La température est maintenue à 95°C pendant 10 minutes afin de dénaturer des dimères d'ADN pouvant avoir été formés et en permettant l'activation de la polymérase Taq. La polymérase JumpStart est couplée à un anticorps qui inhibe son activité et ne peut être activée que lorsque l'anticorps est dénaturé par la chaleur. Ceci élimine la possibilité d'amplification non-spécifique. Chaque cycle d'amplification est ensuite constitué d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, une étape d'hybridation des amorces sur l'ADN à 57°C pendant 20 secondes, une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C et une étape de lecture de 10 secondes à 80°C. Cette dernière étape n'est pas nécessaire à l'amplification de l'ADN. Nous avons inclus cette étape dans le programme afin d'effectuer une lecture de la fluorescence à une température où l'élongation serait terminée et où le minimum de dimères d'amorces pourraient se former tandis que l'ADN synthétisé reste double-brin. Une lecture à cette température permet d'éliminer le bruit de fond généré par des dimères d'amorces ou par l'hybridation d'ADN non spécifique. La dernière étape consiste à faire augmenter graduellement la température du milieu réactionnel et de lire la fluorescence générée. Cette étape permet de déterminer si des produits non-spécifiques ont été générés lors de l'amplification. La sonde utilisée pour la détection de l'amplification de l'ADN est le SybrGreen de Molecular Probe.

**Chapitre IV: RÉSULTATS**

## **1-Influence positive de la surexpression de l'ADNc de ErbB2 sur la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents éléments de réponse aux estrogènes**

Afin de nous assurer que la surexpression augmente bel et bien la fonction transcriptionnelle du récepteur des estrogènes alpha nous avons premièrement voulu étudier l'effet de la surexpression de ErbB2 sur deux types de promoteurs artificiels pouvant répondre à l'estradiol en absence ou en présence du récepteur des estrogènes alpha (HEG0). Ces expériences ont été réalisées dans des cellules ER négatives de lignée HEK293. La lignée HEK provient de cellules épithéliales de rein. Cette lignée n'exprime ni ER $\alpha$  ni ER $\beta$ , ce qui permet d'étudier l'un ou l'autre des récepteurs, de type sauvage ou mutant. Les deux types d'éléments de réponses étudiés sont un ERE classique (construction ERE<sub>3</sub>-TATA-LUC) et un élément de réponse non classique de type AP1 ou TRE pour TPA (tétradecanoylphorbolacetate) Response Element (construction AP1<sub>6</sub>-EBV-CAT).

### **1.1-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur artificiel ERE<sub>3</sub>-TATA de manière dépendante au ER $\alpha$**

La transcription de gène sous le contrôle d'un ERE est activée par les estrogènes et inhibée par les antiestrogènes. Nous avons voulu étudier l'effet de la surexpression de ErbB2 sur la transcription du ER $\alpha$  en présence d'estrogènes et d'antiestrogènes. Pour ce faire nous avons transfecté un gène rapporteur luciférase sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur minimal et de 3 ERE dans les cellules HEK 293 qui sont ER $\alpha$  négatives.

Comme nous nous l'attendions, la figure 10a nous montre que l'expression du gène luciférase est modulée positivement par l'estradiol et négativement par les antiestrogènes lorsque le gène rapporteur est co-transfecté avec le ER $\alpha$ . L'antiestrogène total ICI 182,780 a un effet inhibiteur plus prononcé que l'antiestrogène partiel tamoxifène (tam) sur la transcription.

La présence de ErbB2 co-transfecté avec le ER $\alpha$  (HEG0) dans les cellules HEK293 augmente la transcription du gène rapporteur luciférase sous le contrôle de 3

ERE. En effet, la surexpression de ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur d'environ 1,5 fois en absence de traitement, en présence de E2 et en présence de tamoxifène. Nous pouvons de plus observer une augmentation du niveau de transcription dans les cellules transfectées avec le cDNA de ErbB2 traitées avec l'antiestrogène complet ICI comparé aux cellules n'ayant pas été transfectées avec ErbB2. Une analyse statistique utilisant le test de Student montre qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre l'expression de la luciférase dans les cellules transfectées avec le cDNA de ErbB2 et celles transfectées avec le vecteur contrôle.

La différence entre l'activité luciférase des cellules transfectées avec ErbB2 et celles transfectées avec le vecteur contrôle lors de traitement au ICI peut être expliquée par la présence de niveaux d'ARNm basal résiduel. Nous avons vu que le niveau basal de transcription est augmenté par ErbB2. Dans ces expériences, les cellules sont pré-traitées 24 heures dans du milieu sans sérum après transfection et ensuite traitées avec hormones et anti-hormones. Il y a donc une période de 24 heures dans laquelle le gène de la luciférase est transcrit sans être inhibé par le ICI. Il y a donc une possibilité que l'augmentation de la transcription en présence de ICI dans les cellules transfectées avec ErbB2 soit causée par des niveaux résiduels de l'ARNm de la luciférase transcrit avant le traitement au ICI. De fait, l'ajout des hormones et antiestrogènes au même moment de la transfection des cellules élimine l'effet positif de la surexpression de ErbB2 sur l'expression de la luciférase sous le contrôle promotionnel de 3 ERE (fig.20 annexe I) sans affecter l'effet de la surexpression de ErbB2 sur la transcription sous les autres traitements. Varier la concentration des antiestrogènes lors des expériences de transactivation permettrait aussi de départager plus clairement la différence de l'influence de ErbB2 sur la transcription sous le tamoxifène et le ICI ainsi qu'une représentation du comportement in vivo de ces composés où leur concentration varie lors du métabolisme.

### **1.2-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT sous le contrôle d'un promoteur artificiel AP1<sub>6</sub>-EBV de manière indépendante au ER $\alpha$**

Le facteur de transcription AP-1 est modulé positivement par les voies des MAP kinases Erk, JNK et p38. ErbB2 peut activer plusieurs voies de signalisation intracellulaire résultant en l'activation de AP-1. Par exemple, ErbB2 peut activer la voie des MAP kinases Erk ainsi que la voie des JNK. Erk phosphoryle et active Elk, un facteur de transcription pouvant se lier au promoteur de c-fos et augmenter son expression tandis que JNK active AP-1 en phosphorylant directement c-Jun qui permet l'augmentation du recrutement de p300/CBP au facteur de transcription.. Afin d'étudier les effets de ErbB2 sur AP-1, nous avons utilisé un gène rapporteur chloramphénicol-acétyl-transférase sous le contrôle d'un promoteur minimal et de 6 éléments AP1.

Tel qu'attendu, l'expression de ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT en l'absence du récepteur des estrogènes (Fig 10b). Cette augmentation (2.4x) est inférieure à celle obtenue en présence de TPA, qui active la voie PKC-MAP kinase par 5 fois. Cependant, ErbB2 est aussi capable d'augmenter la transcription sous le contrôle de AP-1 stimulée par 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Ce résultat suggère que ErbB2 et TPA peuvent agir de concert afin d'activer la transcription d'un gène sous le contrôle transcriptionnel d'un site TRE, et donc que les voies de signalisation activées par ErbB2 et la voie de la PKC activée par TPA peuvent agir de manière coopérative sur un promoteur AP-1/TRE.

### **1.3-ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT sous le contrôle d'un promoteur artificiel AP1<sub>6</sub>-EBV en présence du récepteur des estrogènes alpha**

Le récepteur des estrogènes n'active pas la transcription de gènes cibles seulement qu'en liant l'ADN à des sites ERE. Le ER $\alpha$  peut activer la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnel du facteur de transcription AP-1 formé d'homodimère des membres de la famille Jun ou d'hétérodimères des membres de la famille Jun et Fos. La plupart des études sur les effets de ErbB2 sur l'activité transcriptionnelle du ER sont faites sur des gènes sous le contrôle d'éléments de réponses aux estrogènes classiques. Nous avons donc voulu déterminer les effets de la surexpression de ErbB2 sur un élément de réponse aux estrogènes non-classique de type



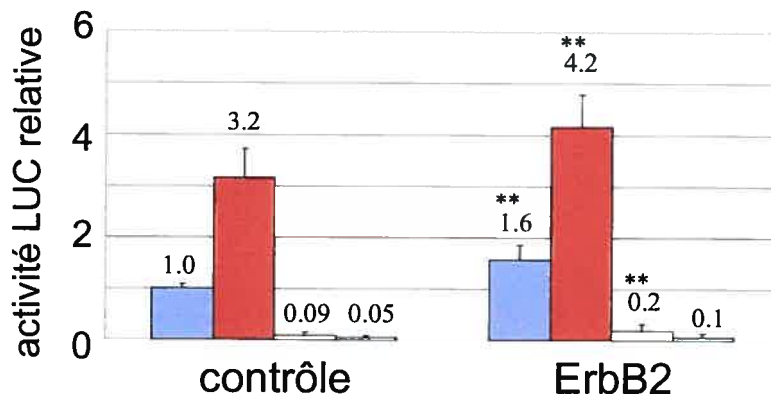
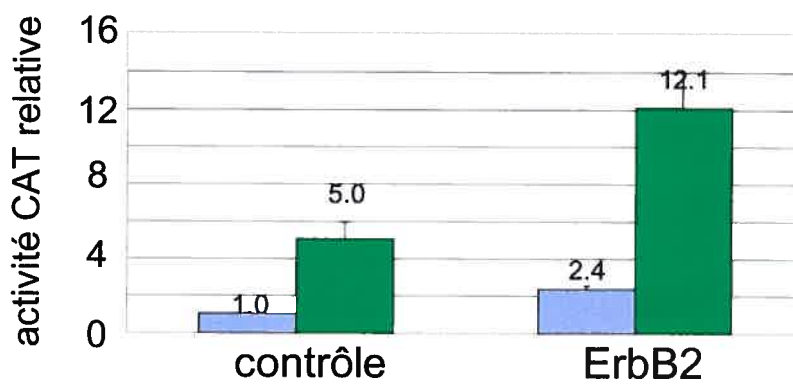
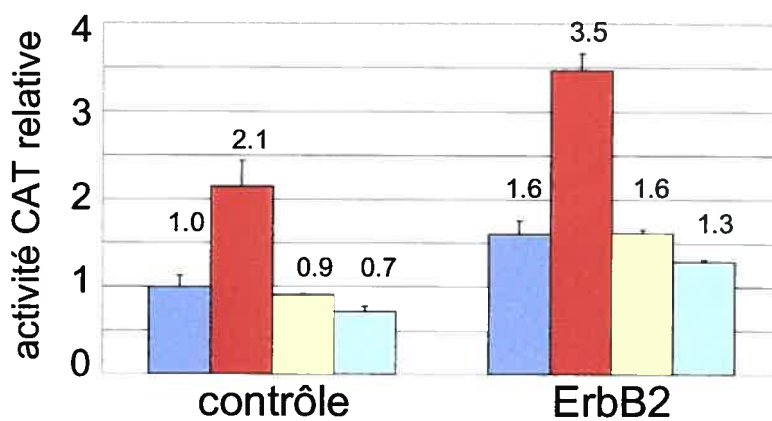
TRE/AP-1. Tel que démontré précédemment, ErbB2 peut augmenter l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  et de AP-1. Il est donc possible que ErbB2 active un complexe AP-1/ER $\alpha$  de manière synergistique en activant les deux facteurs de transcription simultanément. Afin d'étudier ces effets, nous avons co-transfecté le récepteur des estrogènes alpha avec la construction AP1<sub>6</sub>-TATA-CAT utilisé en Fig. 10b.

En figure 10c, la surexpression de ErbB2 augmente la transcription du gène rapporteur CAT en présence du ER $\alpha$ . Le traitement des cellules avec l'estradiol (E2) augmente la transcription du gène CAT d'environ 2 fois tandis que le traitement aux antiestrogènes tamoxifène et ICI diminue la transcription, mais avec beaucoup moins d'efficacité que sur un gène contrôlé par un ERE. Le patron d'expression du gène CAT dans les cellules surexprimant ErbB2 est similaire au patron obtenu en absence de cet oncogène. La stimulation de la transcription est toujours augmentée par un facteur de 2 par l'estradiol. Le tamoxifène ne semble par contre pas inhiber la transcription et le ICI diminue faiblement l'expression du gène CAT. Les cellules surexprimant ErbB2 ont des niveaux d'expression du gène CAT plus élevés que les cellules transfectées avec le vecteur vide. La transcription en absence de traitement ou stimulée par E2 est augmentée d'environ 1,5 à 2. Les données de la figure 10b en conjonction avec l'augmentation substantielle de la transcription lors de traitement avec ICI dans les cellules transfectées avec ErbB2 nous suggère que les mécanismes par lesquels ErbB2 augmente la transcription d'un gène sous le contrôle transcriptionnel d'un site AP1 dans les cellules HEK 293 sont indépendants du récepteur des estrogènes. Nous aurions pu nous attendre à un effet synergique possible entre l'effet positif de ErbB2 sur le dimère cFos/cJun et l'effet positif sur le récepteur des estrogènes alpha par phosphorylation du domaine AF-1, mais cela ne semble pas être le cas. De plus, les niveaux d'expression basale du gène rapporteur CAT n'est pas influencée par la co-transfection du ER $\alpha$  (données non-montrées, N=2). Ce résultat renforce l'hypothèse stipulant que ErbB2 médie ses effets sur un promoteur contenant un site AP-1 indépendamment du récepteur des estrogènes. L'expression de ErbB2, n'activant pas la transcription ER $\alpha$  dépendante sur un site AP-1, n'influence pas non plus l'efficacité des estrogènes à activer la transcription.

**Figure 10: Influence positive de la surexpression du cDNA de ErbB2 sur la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents éléments de réponse aux estrogènes**

Des cellules épithéliales de rein humain de lignée HEK293 ER négatives ont été transfectées par phosphate de calcium dans des plaques à 6 puits de manière transitoire (méthode de précipitation de l'ADN par phosphate de calcium) avec le vecteur pEV7-ErbB2 contenant le cDNA de ErbB2 ou avec le vecteur vide pEV7 (contrôle). Ces vecteurs ont été co-transfectés avec pSG5-HEG0 et le plasmide rapporteur ERE3-TATA-LUC (A), avec le plasmide rapporteur AP16-TATA-CAT sans pSG5-HEG0 (B) ou avec pSG5-HEG0 (C). Un vecteur contrôle de transfection CMV-bGal a aussi été co-transfecté. Les cellules ont été mises en culture dans du milieu DMEM sans rouge de phénol en absence de sérum 24h avant des les mettre en présence de  $2,5 \times 10^{-8}$  M estradiol (E2) ,  $10^{-6}$  M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$  M ICI182,780 (ICI) ou de 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) en solution dans de l'éthanol. Les données brutes des essais enzymatiques luciférase (A) et Chloramphenicol Acetyl-Transferase (B, C) ont été normalisées par bGal. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 3 fois (la figure représentée est la moyenne de ces 3 expériences) (A) et 2 fois (résultat représentatif des 2 expériences) (B,C). Le t-test païré a été utilisé pour déterminer si la différence entre ErbB2 et le contrôle pour chaque traitement sont statistiquement significatives \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

Figure 10

A. ERE3-TATA-LUC+ ER $\alpha$ B. AP1<sub>6</sub>-TATA-CATC. AP1<sub>6</sub>-TATA-CAT + ER $\alpha$ 

■ 0 
 ■ E2 
 ■ TAM 
 ■ ICI 
 ■ TPA

## 2-Génération d'une population de cellules surexprimant l'oncogène ErbB2

Afin de pouvoir étudier l'effet de la surexpression de ErbB2 à long terme, nous avons généré une population de cellules mammaires MCF-7 ER positives surexprimant ErbB2. Cette population a été générée par infection rétrovirale d'un vecteur AP2 contenant le cDNA pour ErbB2 empaqueté dans un virus de stomatite vésiculaire recombinant de pseudotype G (Galipeau, Li et al. 1999). Après infection, les populations ont été enrichies de cellules infectées en sélectionnant les cellules exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) codée dans le vecteur AP2 par FACS (fluorescence activated cell sorting). Le type cellulaire MCF-7 a été sélectionné comme lignée parentale pour plusieurs raisons. La lignée MCF-7 constitue un modèle cellulaire de carcinomes mammaires humains, exprime fortement de manière endogène ER $\alpha$  et faiblement ER $\beta$  et n'exprime que de faibles niveaux de ErbB2. Nous avons aussi choisi ce type cellulaire afin de pouvoir comparer nos données avec celles obtenues à partir de clones surexprimant ErbB2 générés dans d'autres laboratoires (Dowsett 2001). La génération d'une population de cellules MCF-7 surexprimant ErbB2 permet d'éliminer la problématique de l'utilisation d'un clone dont le phénotype a pu diverger de celui de la lignée parentale pendant la sélection.

La figure 11 illustre les données obtenues lors de l'enrichissement de populations exprimant le vecteur AP2 avec la séquence codante de ErbB2 ou la lignée contrôle exprimant le vecteur AP2 vide. La lignée contrôle sera dorénavant appelée "AP2" et la lignée surexprimant ErbB2 sera nommée "ErbB2". Nous pouvons voir en A une expérience contrôle où la fluorescence de cellules MCF-7 non-infectées a été mesurée par FACS. Ces données nous montrent que les cellules MCF-7 n'exprimant pas la GFP ne fluorescent pas à plus de 10 unités de fluorescence dans le spectre de la GFP. Ces données nous ont permis de décider de sélectionner les cellules ayant une intensité de fluorescence plus élevée que 10 unités de fluorescence (M2). Les cellules ayant un plus faible niveau de fluorescence (M1) sont considérées comme n'ayant pas été infectées ou ayant des niveaux d'expression du transgène contenant la GFP trop faibles. En 11b, nous pouvons voir la proportion de cellules MCF-7 infectées avec le vecteur AP2 vide. Nous pouvons voir que la majorité des cellules (88.5%) ont une intensité

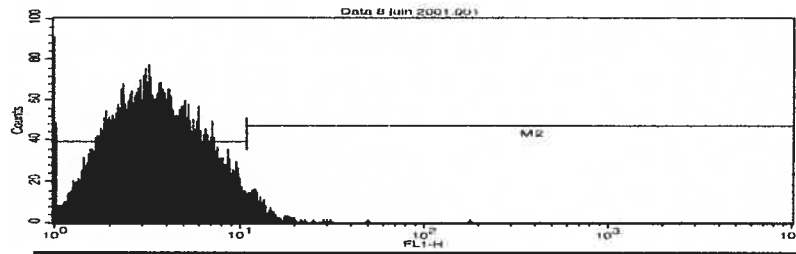
d'environ 100 unités de fluorescence. Les cellules de lignée AP2 ont été passées au FACS 2 fois pour pouvoir obtenir ce pourcentage de cellules positives. Finalement en 11c nous pouvons voir la proportion de cellules exprimant la GFP et par le fait même exprimant ErbB2. Tout comme la lignée AP2, la majorité des cellules de la lignée ErbB2 (82.6%) ont une intensité d'environ 100 unités de fluorescence, 10 fois plus que la limite inférieure de sélection établie à partir des données de fluorescence de la lignée MCF-7 sauvage en 11a. Cette proportion de cellules exprimant ErbB2 a été obtenue après 3 passages au FACS.

**Figure 11: Sélection d'une population de cellules surexprimant l'oncogène ErbB2 par FACS**

Des cellules MCF-7 ont été infectées avec un rétrovirus contenant le vecteur AP2 vide (AP2) ou le vecteur AP2 contenant le cDNA de l'oncogène ErbB2 (ErbB2). Après infection, les populations ont été enrichies de cellules infectées en sélectionnant les cellules exprimant la protéine fluorescente verte (GFP) codée dans le vecteur AP2 par FACS (fluorescence activated cell sorting). Les cellules MCF-7 non-infectées ont été utilisées afin de déterminer le seuil minimal de fluorescence requise pour la sélection de cellules "positives".

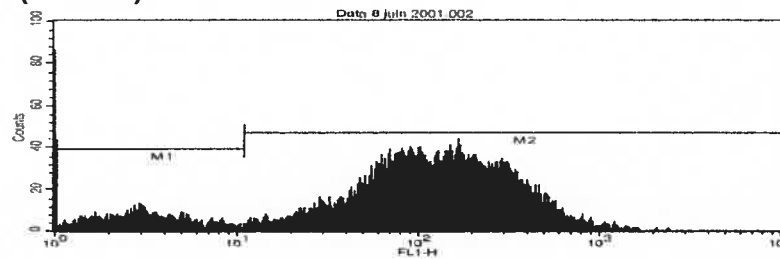
Figure 11

## A. MCF-7



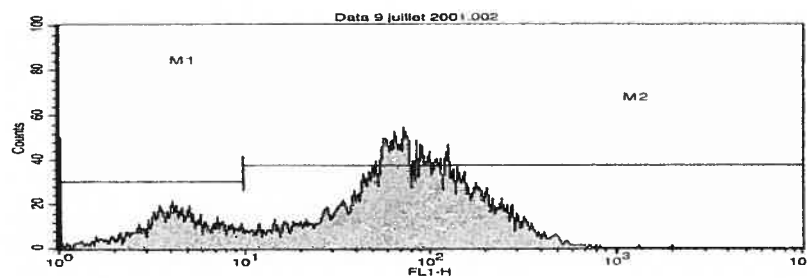
MARQUEUR	# Événements	% Gated	% Total
Tous	10000	100,00	100,00
M1	9670	96,70	96,70
M2	341	3,41	3,41

## B. AP2 (facs2)



MARQUEUR	# Événements	% Gated	% Total
Tous	10000	100,00	100,00
M1	1151	11,51	11,51
M2	8850	88,50	88,50

## C. ErbB2 (facs3)



MARQUEUR	# Événements	% Gated	% Total
Tous	10000	100,00	100,00
M1	1749	17,49	17,49
M2	8258	82,58	82,58

### 3-Characterisation des protéines clés des lignées cellulaires ErbB2 et RasV12

Afin de s'assurer de la validité des lignées cellulaires étudiées dans ce projet de recherche, nous avons effectué des immunobuvardages de type western pour différentes protéines ayant un lien avec nos futures expériences.

Nous avons obtenu une lignée de MCF-7 exprimant de manière stable la forme constitutivement active de la petite GTPase Ras; RasV12. Nous allons étudier cette lignée cellulaire en parallèle avec la lignée ErbB2 afin de pouvoir déterminer la ou les voies par lesquelles ErbB2 module l'activité du récepteur des estrogènes. La protéine Ras est active lorsque liée au GTP et inactive lorsque liée au GDP. La forme activée contient une mutation inhibant l'activité GTPase de la protéine. Ras reste donc continuellement associée au GTP et reste donc constamment active. Nous utilisons la lignée cellulaire RasV12 afin de déterminer si l'effet de ErbB2 sur le ER est médié en partie ou en totalité par la voie des MAPkinases Ras/Raf/Erk. Ces cellules nous ont été fournies par le laboratoire du Dr Gerardo Ferbeyre. Les lignées pBabe et RasV12 ont été générées à partir de cellules MCF-7 infectées avec un rétrovirus contenant le vecteur pBabe vide ou le vecteur pBabe contenant la séquence codante pour RasV12 (Serrano, Lin et al. 1997; Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000; Mallette, Goumard et al. 2004).

Nous avons tout d'abord observé la quantité et l'état de la protéine ErbB2. Nous pouvons voir clairement que cette protéine est exprimée dans tous nos types cellulaires et qu'elle est très fortement exprimée dans la lignée ErbB2 transfectée de manière stable avec le cDNA du gène ErbB2/Her2/neu. Trois bandes sont révélées lorsque l'anticorps contre la forme non-phosphorylée de ErbB2 est utilisé. ErbB2 possède plusieurs sites de phosphorylation dans sa queue cytoplasmique C-terminale, il est donc possible que les 3 bandes observées soient des formes des ErbB2 différemment phosphorylées. La variation du nombre de résidus phosphorylés pourraient faire varier le taux de migration de la protéine, ce qui résulterait en 2 bandes supplémentaires observées à des poids moléculaires supérieurs dans la lignée ErbB2. Un anticorps phospho-spécifique nous révèle que ErbB2 est fortement phosphorylé, donc activé, dans la lignée ErbB2. Il nous est par contre impossible de conclure si cette augmentation de la phosphorylation comparée aux autres types cellulaires est due simplement à l'augmentation des niveaux

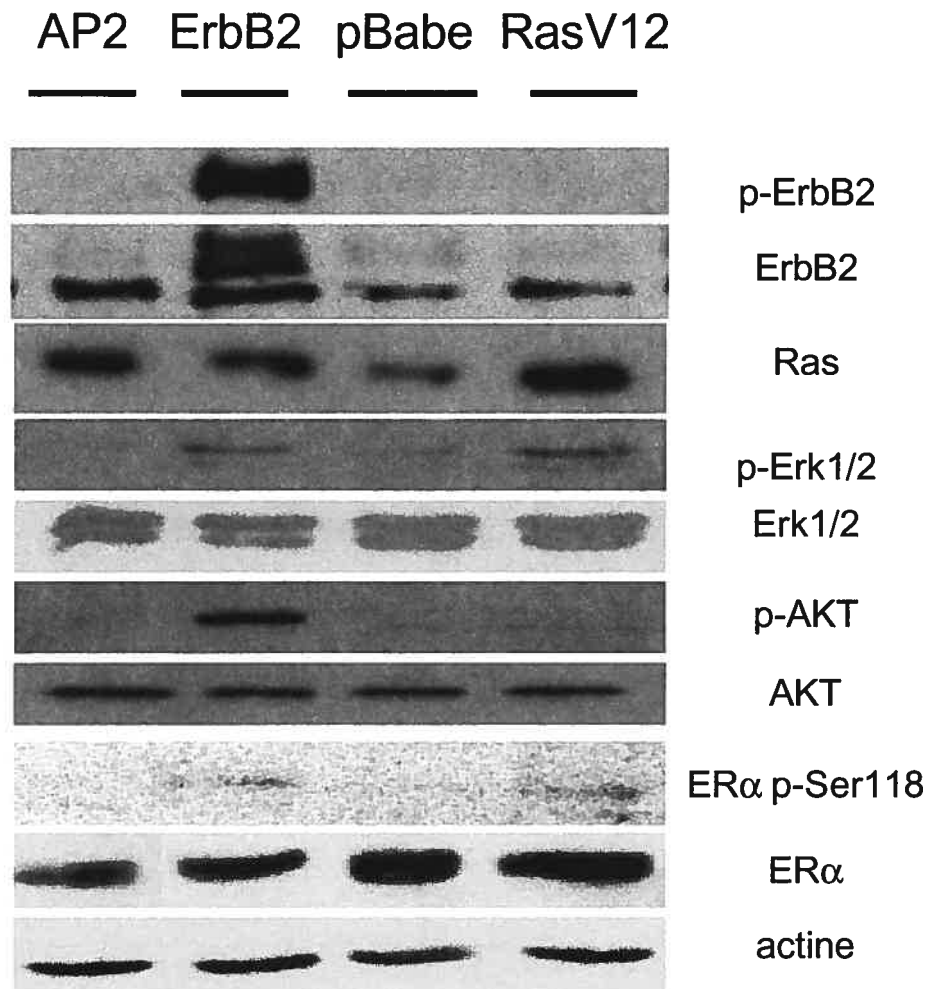


de ErbB2 ou si la surexpression favorise la dimérisation conduisant à l'activation du récepteur. Nous pouvons aussi voir que l'expression de ras dans la lignée RasV12 est supérieure à l'expression de cette protéine dans la lignée contrôle pBabe. La surexpression de cette protéine est par contre moins forte que la surexpression de ErbB2. Ceci est dû au fait que les cellules MCF-7 expriment déjà de manière forte plusieurs isoformes de la protéine h-ras. De plus, l'anticorps utilisé reconnaît tous les isoformes de ras humains (h-ras, ki-ras, N-ras, etc.). Si l'on observe par contre une des cibles de la voies Ras/Raf, on peut voir que celle ci est bel et bien activée dans la lignée cellulaire RasV12. p42/44 Erk1/2 est phosphorylé de manière plus importante dans les lignées ErbB2 et RasV12 sans que le niveau d'expression de la protéine ne soit changé. Ceci nous montre que la surexpression de ErbB2 et de la forme constitutivement active de Ras peut activer la kinase Erk et que l'effet de la surexpression de ErbB2 sur les cellules de carcinomes mammaires pourrait en partie être effectué par la voie des MAP kinases Ras/Raf. On peut voir que seules les cellules surexprimant ErbB2 sont en état d'activer par phosphorylation la kinase AKT/PKB. Cette kinase est un effecteur de la voie de la PI-3 kinase. ErbB2 peut donc dans ces cellules activer la voie Ras et la voie des PI-3 kinases, 2 voies pouvant influencer de manière positive l'activité du ER $\alpha$ . Nos études portant sur les effets de ErbB2 sur la fonction du récepteur des estrogènes alpha, nous avons observé les niveaux d'expression de cette protéine ainsi que la phosphorylation de la sérine 118, sérine centrale dans l'activation de la fonction AF-1 du ER $\alpha$ . Les niveaux de récepteur des estrogènes alpha ne semblent pas être influencés par la présence de RasV12 ou de ErbB2. Le ER $\alpha$  est par contre plus fortement phosphorylé au niveau de la sérine 118 dans les lignées cellulaires ErbB2 et RasV12. Ce patron de phosphorylation concorde avec le patron d'activation de Erk1/2 dans les lignées ErbB2 et RasV12, kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 118 du récepteur des estrogènes alpha.

**Figure 12: Caractérisation des protéines clés des lignées cellulaires ErbB2 et RasV12**

4 à 5 millions de cellules AP2, ErbB2, pBabe et RasV12 ont été cultivées 2 jours dans du milieu DMEM sans rouge de phénol ne contenant pas de sérum dans des pétris de 10cm. 40  $\mu$ g des extraits protéiques ont été chargés sur gel dénaturant de polyacrylamide. Après migration et transfert sur membrane de PVDF, des immunoblots de type western ont été exécutés afin de détecter les formes phosphorylées et non phosphorylées de ErbB2, p42/44 Erk1/2, Akt et ER $\alpha$  (ser 118). Des immunoblots ont aussi été exécutés afin de révéler Ras et  $\beta$ Actine utilisé comme contrôle de la quantité de protéines pour chaque puits. Les expériences ont été reproduites 3 fois (N=3) pour p-ErbB2, ErbB2, p-Erk1/2, Erk1/2, p-Akt, Akt, ER $\alpha$  et 2 fois (N=2) pour p-ER $\alpha$  ser118 et ras.

Figure 12



#### **4-Avantages prolifératifs des lignées MCF-7 surexprimant ErbB2 et RasV12 sur les lignées contrôles**

Afin de vérifier si notre population de cellules surexprimant ErbB2 (lignée ErbB2) se comporte comme les autres modèles cellulaires de surexpression de l'oncogène ErbB2 (Benz, Scott et al. 1993; Pietras, Arboleda et al. 1995; Kurokawa, Lenferink et al. 2000; Witters, Engle et al. 2002; Kurokawa and Arteaga 2003; Shou, Massarweh et al. 2004), nous avons étudié le patron de prolifération cellulaire de notre lignée ErbB2 en présence d'estradiol (E2) ou en présence du SERM tamoxifène (tam) ou de l'antiestrogène complet ICI 182,780 (ICI). La prolifération des cellules a été calculée par le dosage des protéines cellulaires par méthode de Lowry. Nous sommes conscients que les résultats obtenus à partir de cette méthode peuvent être faussés par une augmentation de la synthèse protéique dans des cellules ne se divisant pas ou ne s'étant pas encore divisées. Cependant, nous avons auparavant comparé cette méthode en comparant les résultats obtenus par dosage des protéines cellulaires et celles obtenues par comptage des cellules au microscope à l'aide d'un hématocytomètre dans des expériences effectuées sur une lignée surexprimant ErbB2 dans les cellules MCF-7. Nous avons déterminé que les données de prolifération cellulaire obtenues par dosage des protéines cellulaires étaient conformes à celles obtenues par le comptage des cellules (données non montrées).

##### **4.1-La surexpression de ErbB2 confère un avantage prolifératif aux cellules MCF-7**

En observant la figure 13a il est possible d'observer l'effet de l'estradiol et des antiestrogènes tamoxifène et ICI sur la croissance cellulaire des lignées AP2 et ErbB2. L'estradiol induit la prolifération des cellules contrôle AP2 tandis que le tamoxifène et le ICI l'inhibent. Ce patron est conforme au comportement des cellules de carcinomes mammaires MCF-7 lorsque mises en présence de ces composés. Les cellules de la lignée ErbB2 se comportent sensiblement de la même façon que les cellules de la lignée contrôle, mais leur prolifération semble être moins stimulée par l'estradiol. De plus, la figure 13a montre que la lignée ErbB2 a un avantage prolifératif marqué sur la lignée contrôle AP2. La prolifération cellulaire est augmentée de 1,5 à 2 fois dans les cellules

surexprimant ErbB2 comparé à la prolifération des cellules contrôles AP2. Il est à noter que la croissance de la lignée ErbB2 sous traitement tamoxifène est presque équivalente au niveau de croissance de la lignée AP2 stimulée par l'estradiol. La prolifération des cellules traitées à l'antagoniste complet du récepteur des estrogènes ICI est augmentée lorsque ErbB2 est surexprimé. De plus, la stimulation de la prolifération par l'estradiol dans les cellules ErbB2 est moins importante que celle observée dans les lignées contrôle. Ceci suggère que ErbB2 utilise des mécanismes indépendants du récepteur des estrogènes pour influencer la croissance des cellules. L'inhibition de la prolifération des cellules surexprimant ErbB2 par les antiestrogènes montre que la fonction du récepteur des estrogènes dans la régulation de la prolifération des cellules de cette lignée n'est cependant pas abolie.

Ces données confirment que nos populations surexprimant ErbB2 se comportent de manière similaire aux clones MCF-7/HER2 utilisés comme modèle d'étude dans la littérature au niveau prolifératif. Les effets de ErbB2 sur la prolifération en absence de traitement sont par contre plus faibles dans notre lignée que ceux observés dans les clones MCF-7/HER2 (1,8 contre 3,5 fois comparées aux cellules contrôles) (Kurokawa, Lenferink et al. 2000). Cette différence d'activation est probablement due au fait que le clone a été sélectionné pour une forte surexpression de ErbB2 (45 fois supérieures aux cellules contrôles) tandis que notre population contient un mélange de cellules surexprimant fortement et faiblement ce gène.

#### **4.2-RasV12 confère un avantage prolifératif aux cellules MCF-7**

La figure 13b nous montre l'effet de l'expression d'un mutant constitutivement activé de Ras sur la prolifération cellulaire. La prolifération de la lignée contrôle est induite par l'estradiol et inhibée par le tamoxifène et le ICI respectivement de manière conforme au patron observé généralement dans les lignées cellulaires répondant aux estrogènes et antiestrogènes. La lignée RasV12 possède un avantage prolifératif par rapport aux cellules contrôle. La présence de RasV12 augmente la prolifération générale de 1,4 à 2 fois comparée aux cellules contrôles dépendamment des traitements. Tout

comme pour la lignée ErbB2, l'estradiol induit la prolifération des cellules de la lignée RasV12 moins fortement que dans la lignée contrôle.

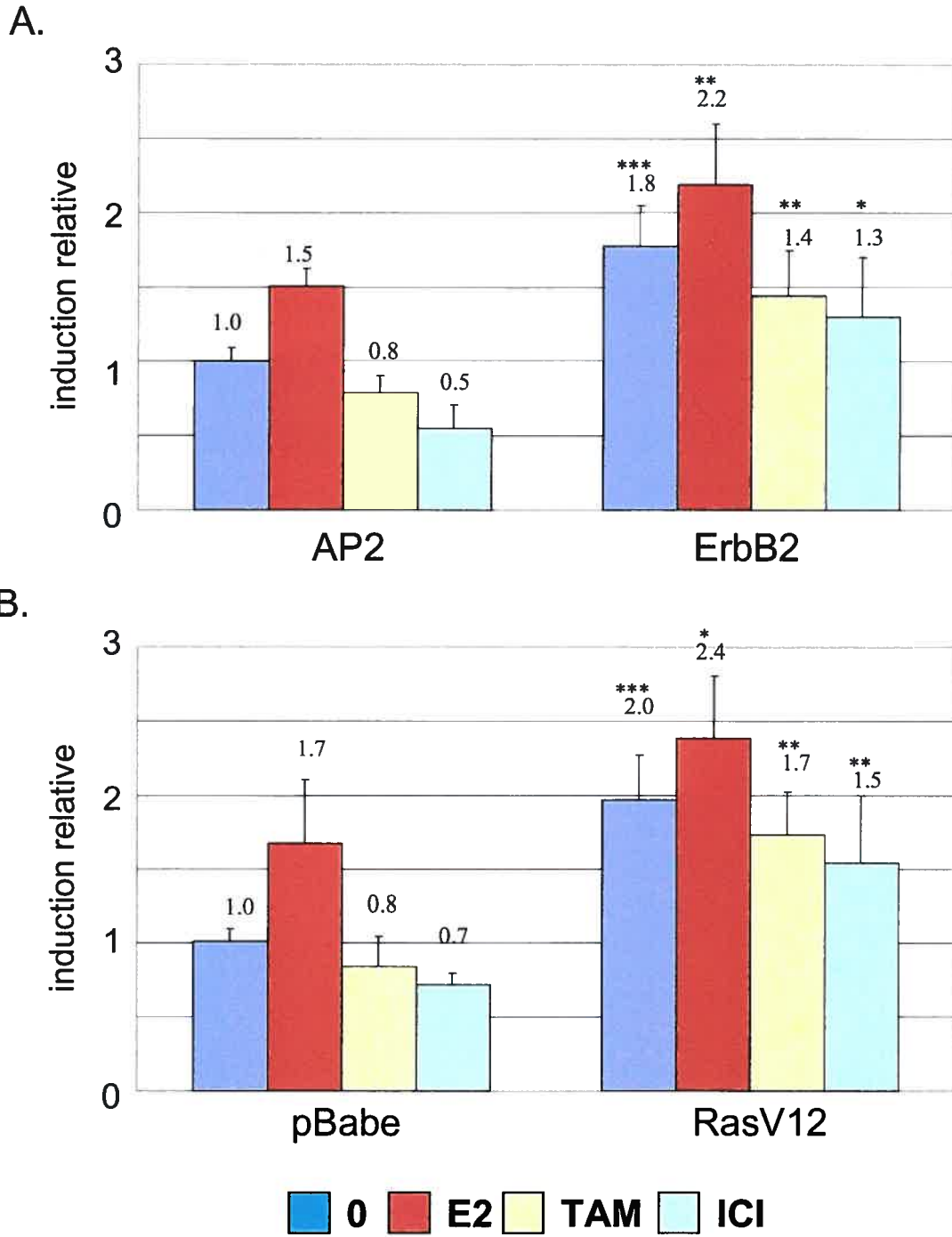
Ceci est-il indicateur du développement d'une indépendance aux estrogènes par l'activation de la voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk par ErbB2 et RasV12 ou les cellules atteignent-elles un niveau de prolifération maximale lorsque de l'activation des voies stimulées par Ras en présence d'estradiol? Tel qu'observé dans la figure 12, la sérine 118 du ER $\alpha$  est phosphorylée dans les lignées ErbB2 et RasV12. Cette sérine étant déjà phosphorylée les voies effectrices de ErbB2 et RasV12, la cycline D en présence d'estrogènes ne pourrait pas activer le domaine AF-1 plus fortement. L'effet de l'estradiol dans les lignées ErbB2 et RasV12 pourrait être atténué parce qu'un des effets causé par la liaison de l'estradiol (phosphorylation de ser118 du domaine AF-1) a déjà été effectuée par un autre facteur. De fait, la coopération entre les voies activées par ErbB2/Ras en plus de l'effet de l'estradiol pourraient contribuer à ce que ER $\alpha$  atteigne un plateau de stimulation maximale.

Les deux lignées cellulaires ErbB2 et RasV12 ont un patron de prolifération cellulaire très similaire, ceci nous suggère que les mécanismes d'activation la prolifération cellulaire par ErbB2 pourraient être les mêmes que RasV12.

**Figure 13: Avantage prolifératif des lignées cellulaires surexprimant ErbB2 et RasV12**

Les cellules de lignées AP2 et ErbB2 (A) ainsi que RasV12 et pBabe (B) ont été cultivées pendant 6 jours dans du milieu DMEM sans rouge de phénol complété avec 5% de FBS filtré au charbon en présence de  $1 \times 10^{-7}$ M estradiol (E2) ,  $10^{-6}$ M tamoxifène (Tam) ou  $10^{-7}$ M ICI 182,780 (ICI) en solution dans de l'éthanol. Les cellules ont auparavant été synchronisées en G0 en les cultivant 24h dans du milieu DMEM sans phénol ne contenant pas de sérum. La prolifération cellulaire a été mesurée par le dosage des protéines cellulaires extraites avec NaOH 1N par la méthode de Lowry. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 3 fois (n=3). Les résultats présentés ont été fait à partir de la moyenne de chaque expériences. Le t-test pairé a été utilisé pour déterminer si la différences entre les lignées cellulaires sont statistiquement significatives pour chaque traitement \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05

Figure 13





## 5-Transcription de gènes cibles du ER *in vivo*

Nous avons précédemment observé le comportement du ER $\alpha$  sur deux types d'éléments de réponse aux estrogènes co-transfectés avec le cDNA de ErbB2 dans des cellules HEK293. Afin de déterminer l'effet de ErbB2 sur la fonction transcriptionnelle du ER dans un contexte *in vivo*, nous avons étudié le patron d'expression de divers gènes cibles endogènes du récepteur des estrogènes sous le contrôle transcriptionnel de divers types d'éléments de réponses dans des cellules de carcinomes mammaires exprimant le récepteur des estrogènes alpha (MCF-7) transfectées de manière stable avec ErbB2 ou RasV12. Les types éléments de réponse aux estrogènes régulant l'expression des 3 gènes étudiés (pS2, PR, et cMyc) ainsi que leur position par rapport au site d'initiation de la transcription de ces gènes sont indiqués dans le tableau 1. pS2 est un gène dont la régulation transcriptionnelle a été extensivement caractérisée. La plupart des études sur les éléments de réponse aux estrogènes classiques utilisent le ERE en position -405 du site d'initiation de pS2. Le récepteur de la progestérone (PR) est un gène cible sous le contrôle d'un élément ERE/SP1 utilisé comme marqueur de pronostic lors de l'analyse génétique de tumeurs mammaires où l'expression de PR est considérée comme indicatrice d'un ER $\alpha$  fonctionnel (Sommer, Hoffmann et al. 2003). L'expression du gène cMyc est régulée par les estrogènes par l'intermédiaire d'un élément de réponse de type TRE/AP-1. Tout comme ErbB2, cMyc est un oncogène puissant. Il est donc intéressant d'examiner si la surexpression de ErbB2 peut influencer l'expression de cMyc et ainsi permettre une coopération possible entre ces oncogènes.

Nous avons étudié le patron d'expression de ces gènes par analyse de PCR en temps réel. Les lignées ErbB2 et RasV12 ainsi que les lignées contrôles ont été cultivées en absence de sérum pendant 18 heures et ensuite traitées avec de l'estradiol ou des antiestrogènes tamoxifène et ICI 382,780. Les cellules ont été cultivées en absence de sérum afin de pouvoir étudier l'effet de l'homodimérisation forcée de ErbB2 sur la transcription de gènes cibles de ER et non l'effet d'hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille ErbB se produisant en présence de ligand tel EGF, TGF, héréguiline, etc. L'ARN des cellules traitées a ensuite été isolé et une réaction de transcriptase inverse a été exécuté utilisant comme amorce un oligonucléotide ne contenant que des thymidines pour que les ADNc générés soient représentatifs des

ARNm transcrits dans les cellules. Des expériences de PCR en temps réel ont ensuite été réalisées sur ces ADNc en utilisant des amorces d'amplification spécifiques aux gènes étudiés. Chaque amplification a été réalisée en parallèle avec le gène p36B4. Le gène p36B4 est un gène de ménage dont l'expression ne varie pas entre les lignées cellulaires et entre les différents traitements à l'estradiol ou aux antiestrogènes (donnés non montrés).

Gènes répondant aux estrogènes	Type d'élément de réponse	Séquence	Position	reference
pS2	ERE	GCAAGGTCACGGTGGCCACC	-409 à -389	Sanchez, 2002, BioEssays
PR	1/2 ERE	TGACT	+745 à +749	Petz-2003, mol endo
	1/2 ERE	TGACC	+571 à +575	Kastner, 1990, EMBOT
cMyc	AP-1/TRE	TGAGTCA	-1,3kb	Iavarone, 2003, JBC

**Table 1:** Gènes cibles du ER

Le tableau montre les gènes cibles du ER étudiés ainsi que leur type d'élément de réponse aux estrogènes, leur séquence et leur position par rapport au site d'initiation.

### 5.1-L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage est régulé de manière positive par les estrogènes et de manière négative par les antiestrogènes.

Le récepteur des estrogènes contrôle l'expression d'une multitude de gènes. Ce contrôle est exercé en liant directement l'ADN sur des séquences spécifiques, en influençant l'action de facteurs de transcription déjà liés à l'ADN ou en activant certaines voies non-génomiques. Avant d'étudier l'effet de la surexpression de ErbB2 sur l'action transcriptionnelle du ER, nous avons d'abord voulu établir le patron d'expression de ces gènes lorsque traités avec des estrogènes (estradiol/E2) ou des antiestrogènes tamoxifène (Tam) et ICI 182,780(ICI).

Les différents types d'éléments de réponse aux estrogènes ne sont pas régulés de la même manière. Une des différences les plus frappante est le temps requis par le récepteur des estrogènes pour induire l'expression de gènes sous le contrôle de ces différents types d'éléments de réponse. Avant d'effectuer nos expériences, nous avons déterminé la durée de stimulation à l'estradiol requise pour avoir la meilleure activation de la transcription. Il a été déterminé que l'induction optimale pour l'expression de pS2 et PR était après 48 heures de traitement tandis que seulement 2 heures de traitement

étaient requises pour l'induction optimale de l'expression de cMyc (données non montrées).

Les figures 14a et b nous montrent le patron d'expression de deux gènes différents sous le contrôle transcriptionnel du ER après 48h de traitement aux divers composés. Nous pouvons voir que l'estradiol induit l'augmentation de l'expression de pS2 et PR d'environ 2,5 et 4,5 fois par rapport à l'expression basale. L'antiestrogène partiel tamoxifène inhibe 50% et de 30% de l'expression basal des ARN messagers de pS2 et de PR respectivement. L'antiestrogène total ICI 168,384 est encore plus efficace, inhibant l'action du récepteur des estrogènes en diminuant les messagers de pS2 et PR de 70% et 80%.

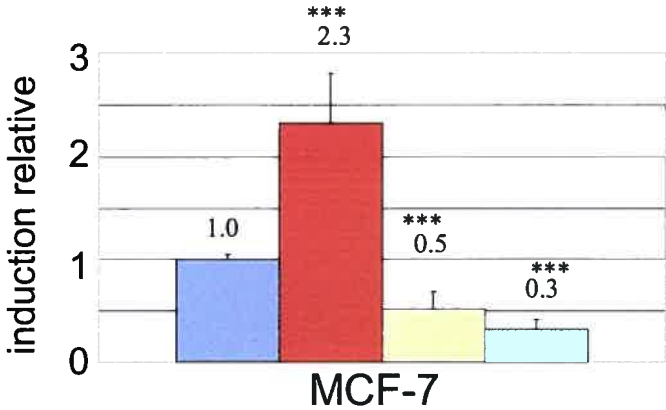
La figure 14c nous montre le patron d'expression du gène cMyc sous le contrôle d'un site TRE (TPA response element) lié par le facteur de transcription AP1. L'expression de cMyc est augmentée d'environ 2,8 fois 2 heures après l'exposition des cellules à  $2.5 \times 10^{-8}$  M d'estradiol. Le tamoxifène diminue la transcription du messenger de cMyc de 40% et ICI de 60%. L'effet de l'antiestrogènes complet ICI sur cMyc ne semble pas être moins marquée comparé aux autres gènes étudiés. Contrairement aux données obtenues dans les cellules HEK avec un élément rapporteur AP1<sub>6</sub>-TATA-CAT, l'activation de la transcription du cMyc sous le contrôle d'un AP-1 ne semble pas être indépendante du récepteur des estrogènes alpha (fig. 11b,c).

**Figure 14: L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage est régulée de manière positive par les estrogènes et de manière négative par les antiestrogènes**

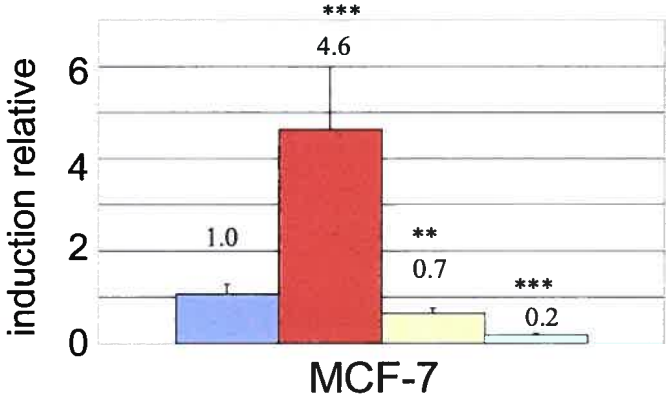
3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules MCF-7 ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénol contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum et ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$  M estradiol (E2),  $10^{-6}$  M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$  M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2 $\mu$ g d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>tm</sup> comme sonde ont ensuite été exécutées. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 3 fois (n=3). Les résultats présentés ont été fait à partir de la moyenne de chaque expériences. Le t-test pairé a été utilisé pour déterminer si les différences entre les traitements et le niveau basal sont statistiquement significatives \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05

Figure 14

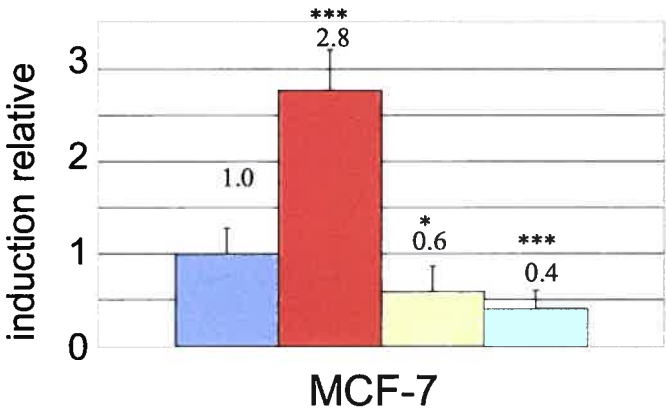
A. pS2



B. PR



C. cMyc



0 E2 Tam ICI

## **5.2-La surexpression de ErbB2 influence l'expression des gènes cibles de ER de manière spécifique du gène**

Toutes les expériences d'expression géniques ont été effectuées en absence de sérum afin de pouvoir étudier l'effet de l'homodimérisation forcée de ErbB2 sur la transcription de gènes cibles de ER et non l'effet d'hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille ErbB se produisant en présence de ligand tel EGF, TGF, héréguiline, etc.

### **5.2.1-ErbB2 et RasV12 augmentent de manière générale la transcription du gène pS2**

Dans la figure 15a nous pouvons voir l'effet de la surexpression de ErbB2 sur la transcription du gène pS2 sous contrôle transcriptionnel d'un ERE en position -405. Le patron d'expression de pS2 dans la lignée contrôle AP2 est similaire au patron d'expression de ce gène dans la lignée MCF-7 de type sauvage. La transcription de pS2 dans les cellules surexprimant ErbB2 est toujours influencée par les estrogènes et les antiestrogènes. Ce patron d'expression de la lignée ErbB2 reste similaire au patron d'expression de la lignée contrôle.

La surexpression de ErbB2 augmente la transcription générale du messager de pS2 sous toutes les conditions. Les niveaux de pS2 ont environ 1,4 à 2,5 fois supérieurs dans la lignée ErbB2 aux niveaux de la lignée contrôle AP2.

Tout comme ErbB2, RasV12 a un effet positif sur la transcription du gène pS2 mais cet effet est plus prononcé que dans la lignée ErbB2. La figure 16a nous montre l'effet de l'activation constitutive de Ras (RasV12) sur la transcription du gène pS2. Le patron d'expression de pS2 dans la lignée contrôle pBabe est similaire à celui vu en figure 14a dans la lignée MCF-7 sauvage.

Le patron d'expression dans les cellules RasV12 diverge par contre avec celui de la lignée contrôle. L'estradiol augmente l'expression de pS2 par 2 fois au lieu de 2,5 et le tamoxifène inhibe la transcription de seulement 30% comparé à 50% dans la lignée pBabe. L'effet de ICI reste semblable à la lignée contrôle. La présence de RasV12

semble influencer la capacité du ER à induire la transcription de pS2 de manière hormono-dépendante.

L'expression de RasV12 augmente la transcription générale de pS2 par rapport à la lignée contrôle n'exprimant pas la forme activée de cette protéine. La lignée RasV12 augmente de plus de 2 fois la transcription de pS2 lorsque ces cellules ne sont pas traitées ou lorsqu'elles sont en présence d'estradiol. RasV12 augmente aussi la transcription de pS2 en présence des antiestrogènes tam et ICI par un facteur d'environ 3 fois. La diminution de réponse aux estrogènes dans la lignée RasV12 pourrait suggérer que RasV12 a un effet indépendant du ER sur la transcription de pS2.

L'augmentation par ErbB2 et RasV12 de la transcription de pS2 sous ICI suggère un mécanisme indépendant du récepteur des estrogènes et/ou dépendant de la présence d'autres éléments régulateurs dans le promoteur pouvant être influencé par ces oncogènes. Tel que mentionné plus tôt, il est possible que cette augmentation de la transcription soit due à des quantités résiduelles d'ARNm de pS2 transcrits avant le traitement au ICI. Les niveaux absolus d'ARNm transcrits sous ICI sont très faibles, une contribution minime de la transcription résiduelle basal augmentant ces niveaux pourrait se traduire par un fort facteur d'induction.

La similarité des effets de la surexpression de ErbB2 et de RasV12 sur l'expression de pS2 suggère que ces deux lignées emploient des mécanismes communs d'activation.

### **5.2.2-La surexpression de ErbB2 et de RasV12 augmentent la transcription de cMyc sous le contrôle transcriptionnel d'un site AP-1**

La figure 15c illustre l'effet de la surexpression de ErbB2 sur l'expression du gène cMyc sous le contrôle d'un TRE. Le patron d'expression du gène cMyc reste similaire entre la lignée AP2 et la lignée MCF-7 vue en Fig. 14c. Le patron d'expression de la lignée ErbB2 est similaire à la lignée contrôle.

La surexpression de ErbB2 augmente de manière générale la transcription de cMyc entre 1,4 et 2 fois selon le traitement. L'augmentation de la transcription dans les cellules surexprimant ErbB2 traitées avec ICI suggère un mécanisme d'activation

indépendant des estrogènes. Comme discuté dans la section 1, cette augmentation pourrait par contre être causée par une expression basal résiduelle. Le patron d'expression du gène cMyc des lignées ErbB2 est similaire au patron d'expression retrouvé lors d'expériences de gènes rapporteurs AP16-TATA-CAT (fig. 10c) dans des cellules HEK 293 transfectées avec ER $\alpha$  et ErbB2. Ceci nous permet de postuler que l'effet de ErbB2 sur la transcription de cMyc aurait une composante indépendante du récepteur des estrogènes.

Une fois de plus, l'expression de RasV12 a un effet positif similaire à ErbB2 mais plus prononcé sur la transcription d'un gène cible de ER. Observant la figure 16c nous voyons toujours que le patron d'expression de cMyc dans les cellules contrôle est similaire au patron vu en figure 14c dans les MCF-7 de type sauvage. Le patron d'expression de cMyc dans la lignée RasV12 varie par rapport au patron d'expression de la lignée contrôle. On voit une moindre induction de la transcription par l'estradiol dans la lignée RasV12 (1,8 fois comparé à 2,4). L'inhibition de la transcription par le tamoxifène est aussi moins efficace dans la lignée RasV12 (15% d'inhibition) que dans la lignée pBabe (25%). RasV12 augmente fortement la transcription du gène cMyc sous toutes les conditions. Dans la lignée RasV12, les niveaux d'expression de cMyc sont augmentés de 1,5 à 2 fois plus par rapport à la lignée pBabe.

La diminution de la réponse à l'estradiol par la lignée RasV12 pour la transcription de cMyc et l'augmentation de la transcription de ce gène sous ICI suggère que l'effet de RasV12 sur la transcription d'un gène cible de ER pourrait être en partie indépendant du récepteur des estrogènes. Les cellules de la lignée ErbB2 conservent par contre leur sensibilité à l'estradiol, impliquant ainsi la présence de mécanismes d'activation de la transcription différents dans les lignées ErbB2 et RasV12. Il faut aussi noter que malgré la forte possibilité que les effets de ErbB2 et RasV12 sur la transcription de cMyc soit indépendants du ER, la transcription de cMyc est toujours diminuée par l'antiestrogène ICI nous montrant que le ER a toujours un rôle dans l'expression de ce gène.



### 5.2.3- ErbB2 et RasV12 ont un effet négatif sur la transcription du gène PR

Nous avons ensuite voulu voir si ErbB2 avait le même effet sur un autre type d'élément de réponse aux estrogènes. Le gène du récepteur de la progestérone est un gène cible de ER sous le contrôle transcriptionnel d'un élément de réponse mixte composé d'un demi-ERE et d'un site SP1 situé en +745 du site d'initiation de PR. Le patron d'expression de ce gène dans la lignée AP2 est aussi similaire au patron observé dans la lignée de MCF-7 de type sauvage.

Contrairement à ce que nous attendions, la surexpression de ErbB2 n'augmente pas l'expression du messenger de PR comme pour le messenger de pS2 (fig. 15a). Les niveaux d'expression de base et après traitement au ICI restent comparables à la lignée AP2 tandis que les niveaux en présence d'estradiol et de tamoxifène sont inhibés de 40% et 55% respectivement dans la lignée ErbB2. ErbB2 semble donc influencer négativement l'expression de PR en présence d'agoniste et d'antagoniste partiel du récepteur des estrogènes.

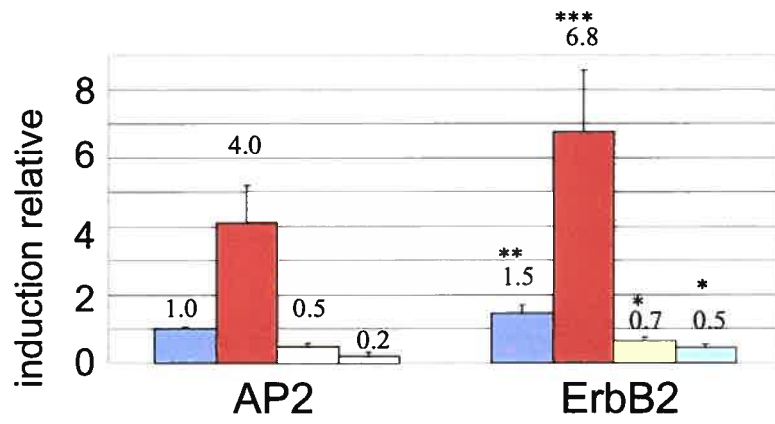
L'expression de RasV12 dans la lignée MCF-7 cause une diminution drastique des niveaux d'expression du gène PR sous toutes les conditions (fig.16b) contrairement à la surexpression de ErbB2 qui influence la transcription de PR de manière négative seulement en présence d'estradiol et de tamoxifène (fig.15b).

**Figure 15: La surexpression de ErbB2 influence l'expression des gènes cibles de ER de manière gène spécifique**

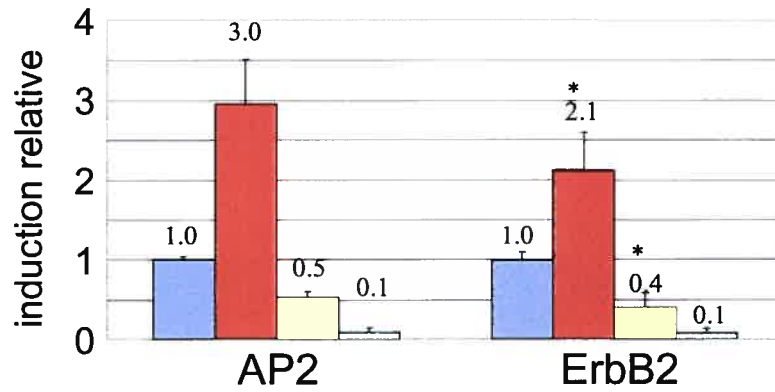
3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules contrôles (AP2) et surexprimant ErbB2 (ErbB2) ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénol contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum et ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$  M estradiol (E2),  $10^{-6}$  M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$  M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2ug d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>™</sup> comme sonde ont ensuite été réalisées. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 3 fois (n=3). Les résultats présentés ont été fait à partir de la moyenne de chaque expériences. Le t-test païré a été utilisé pour déterminer si la différences entre les lignées cellulaires sont statistiquement significatives pour chaque traitement \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05

Figure 15

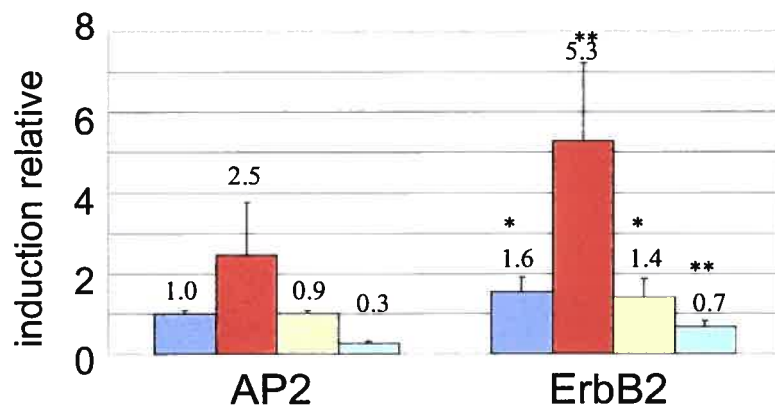
## A. pS2



## B. PR



## C. cMyc



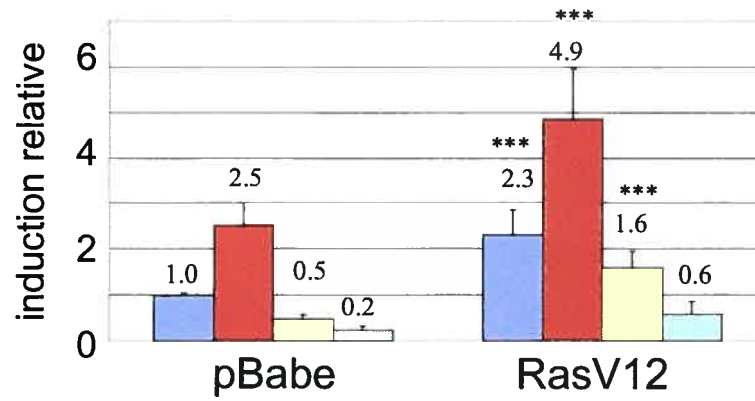
■ 0 
 ■ E2 
 ■ Tam 
 ■ ICI

**Figure 16: La surexpression de la forme activée de Ras (RasV12) influence l'expression des gènes cibles de ER de manière gène spécifique différemment de ErbB2**

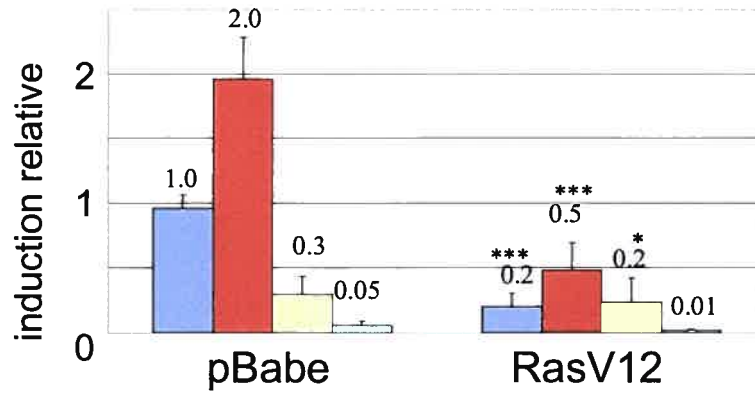
3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules contrôles (pBabe) et surexprimant la forme constitutivement active de Ras (RasV12) ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénol contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum et ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$ M estradiol (E2),  $10^{-6}$ M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$ M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2 $\mu$ g d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>tm</sup> comme sonde ont ensuite été performés. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 3 fois (n=3). Les résultats présentés ont été faits à partir de la moyenne de chaque expériences. Le t-test pairé a été utilisé pour déterminer si la différences entre les lignées cellulaires sont statistiquement significatives pour chaque traitement \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05

Figure 16

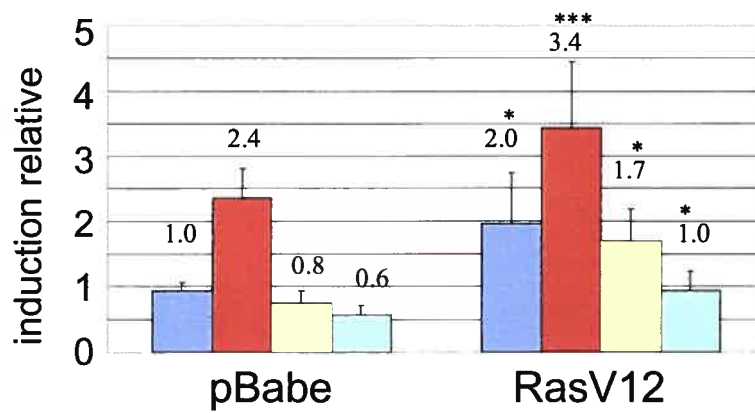
## A. pS2



## B. PR



## C. cMyc



■ 0   
 ■ E2   
 ■ Tam   
 ■ ICI

## **6-Détermination des voies de signalisations responsables des effets de la surexpression de ErbB2 et RasV12 sur la transcription des gènes cibles du ER**

Tel qu'observé dans la figure 12, la surexpression de ErbB2 dans les cellules MCF-7 active au moins deux voies de signalisation intracellulaire. En effet, les kinases Erk1/2 et AKT, effecteurs de la voie des MAP kinases Ras/Raf et PI-3 kinase respectivement, sont toutes deux activées dans la lignée cellulaire ErbB2 tandis que seul Erk1/2 l'est dans la lignée RasV12. Afin de déterminer quelles voies de signalisation intracellulaires sont requises pour que ErbB2 influence la transcription des gènes cibles du ER comme vu précédemment, nous avons étudié le patron d'expression de ces gènes cibles en présence de l'inhibiteur U0126. Ce composé inhibe l'activité de la kinase Mek, une MAP kinase kinase activée par Raf activant Erk par phosphorylation. L'utilisation de ce composé avec l'estradiol ou les antiestrogènes nous permettra de déterminer le rôle joué par la voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk dans l'influence qu'exerce ErbB2 sur la fonction transcriptionnelle du ER $\alpha$ .

### **6.1-Influences différentes de l'inhibiteur de Mek U0126 sur la transcription de gènes cibles du ER dans les MCF-7**

Tel qu'observé dans les figures 15 et 16, les gènes pS2, PR et cMyc sont régulés de façons différentes par les voies de signalisation intracellulaires activées par ErbB2 et RasV12. La figure 17a nous montre l'influence de Mek sur la transcription du gène pS2 sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE. On peut observer que l'inhibition de Mek entraîne une baisse des niveaux de transcription de base et stimulé par l'estradiol. Les niveaux de messenger sous les antiestrogènes tamoxifène et ICI ne semblent pas être affectés par l'inhibiteur. La transcription de pS2 est moins induite en présence de l'inhibiteur qu'en absence de celui-ci (3,8 fois contre 6 fois). Il serait possible que l'inhibiteur de Mek U0126 puisse bloquer les effets non-génomiques du récepteur des estrogènes alpha menant à l'activation de Erk et à l'activation de la fonction AF-1 du récepteur, diminuant l'effet stimulateur de l'estradiol sur la transcription de pS2.

La régulation du gène PR se comporte encore une fois de manière opposée à ce que nous nous attendions. PR est sous le contrôle d'un demi-ERE contigu à un site SP1.

ER $\alpha$  et SP1 étant tous deux des protéines pouvant être régulées de manière positive par Erk, nous nous attendions à ce qu'un traitement au U0126 inhiberait la transcription de l'ARN messager de PR comme nous l'avons observé pour pS2. Les niveaux de transcription sous E2, tamoxifène et ICI ne sont pas affectés par la présence du composé U0126. Le niveau basal par contre, est augmenté de 2,5 fois en présence de l'inhibiteur. L'activation de Mek aurait donc un effet négatif sur la transcription de PR, ce qui explique l'inhibition généralisée de l'expression de ce gènes dans les cellules surexprimant RasV12(fig. 16b).

L'expression du gène cMyc ne semble pas être influencée par l'inhibiteur U0126. Après le recueil de ces données, nous avons pensé que le faible temps d'exposition des cellules au U0126 (2 heures plus 1 heure de pré-traitement contrairement à 48h d'exposition pour pS2 et PR) ne serait pas suffisant pour influencer la transcription du gène cMyc (données non-montrées). Pour toutes nos expériences subséquentes nous avons pré-traité les cellules avec l'inhibiteur pendant 16 heures avant de traiter les cellules avec E2, tam ou ICI. U0126 n'a pas d'effet sur la transcription du gène cMyc dans les cellules MCF-7.

Ce résultat est surprenant car la kinase Erk activée par Mek peut activer la transcription de c-Fos et augmenter l'activité de AP-1. Par contre, nos expériences sont faites en absence de sérum. La transcription de c-Fos est contrôlée par un SRE (serum response element) et Mek est activé par les facteurs de croissances contenus dans le sérum. Il est possible que l'activité de AP-1 soit très basse dans nos cellules cultivées sans sérum et que Mek ne soit pas activé, rendant l'inhibiteur de Mek inutile.

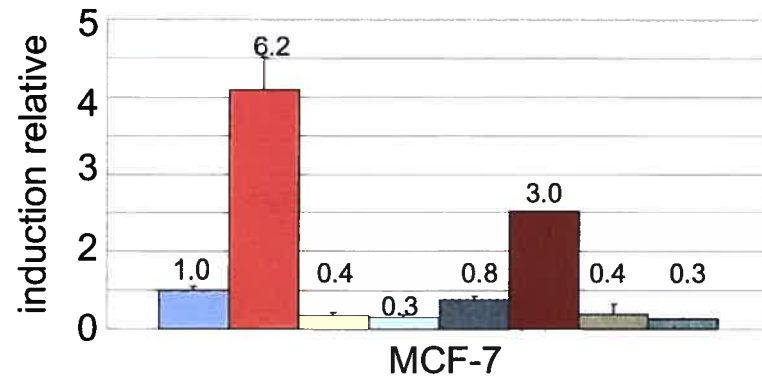
**Figure 17: L'expression de gènes cibles de ER dans les cellules MCF-7 de type sauvage peut être modulée par l'activation de Mek**

3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules MCF-7 ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénoles contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum, prétraitées 1h (A,B) ou 18h (C) avec ou sans l'inhibiteur de Mek U0126. Les cellules ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$ M estradiol (E2),  $10^{-6}$ M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$ M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2 $\mu$ g d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>™</sup> comme sonde ont ensuite été performés. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 2 fois (n=2). Les figures présentées sont faites à partir d'un résultat unique représentatif.

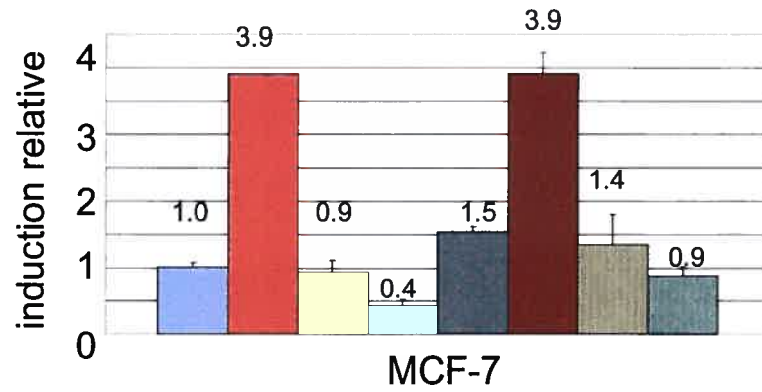


Figure 17

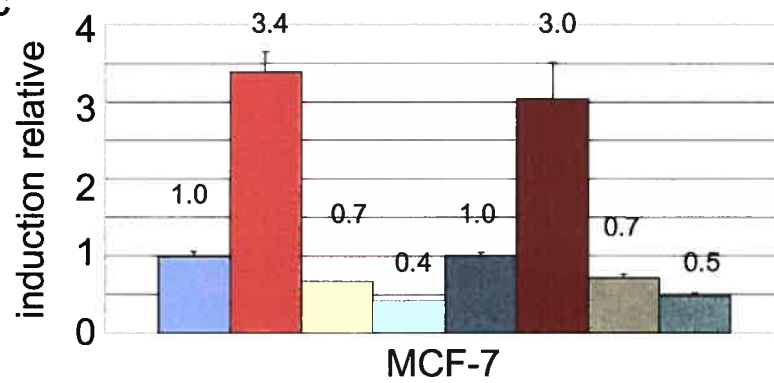
## A. pS2



## B. PR



## C. cMyc



■ 0  
 ■ E2  
 ■ Tam  
 ■ ICI  
 ■ U0126

## **6.2-L'effet de ErbB2 sur les gènes cibles du ER est effectué en partie, mais pas complètement par la voie Ras/Raf/Erk**

### **6.2.1-La voie Ras/Raf/Erk n'est pas nécessaire à l'effet positif de ErbB2 sur la transcription du gène pS2 sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE imparfait**

Dans la figure 18a nous pouvons voir que l'inhibition de Mek par le U0126 inhibe les niveaux de transcription basale et stimulée par estradiol du gène pS2. Les niveaux d'expression de base et induits par l'estradiol diminuent dans la lignée contrôle et la lignée ErbB2. La transcription de pS2 en présence d'antiestrogènes ne semble pas être influencée par l'inhibiteur de Mek. Malgré l'inhibition des niveaux de transcription de base et des niveaux stimulés à l'estradiol par le composé U0126, nous pouvons toujours voir que le message de pS2 est plus présent dans la lignée ErbB2 que dans la lignée AP2. En présence de l'inhibiteur, la transcription de base de l'ARN message de pS2 est toujours supérieure d'environ 2 fois dans la lignée ErbB2. Ces données nous montrent que l'activité de Mek (donc de Erk) est requise pour la transcription de pS2 dans les cellules MCF-7, mais qu'elle est moins importante pour effectuer l'effet positif de ErbB2 sur la transcription de pS2. Ceci nous suggère qu'une autre voie de signalisation, comme celle de la PI-3 kinase, pourrait être responsable de ces effets.

### **6.2.2-L'inhibition de Mek diminue faiblement l'effet de RasV12 sur la transcription du gène pS2**

Tel qu'observé à la figure 16a, l'expression de la forme activée de ras dans des cellules de carcinomes mammaires MCF-7 augmente grandement la transcription du gène pS2. La transcription sous différents traitements est augmentée entre 2 et 5 fois selon le traitement (fig 16a). Tel qu'observé dans la figure 19a, la présence de l'inhibiteur de Mek diminue de beaucoup cet effet. En plus de diminuer de manière générale la transcription de pS2 dans la lignée RasV12, U0126 diminue de beaucoup l'effet spécifique de RasV12 sur l'expression de ce gène, mais n'abolit pas complètement l'effet activateur de la transcription de RasV12. L'effet résiduel peut être causé par deux facteurs. Il est possible que la concentration de U0126 utilisée dans nos expériences soit insuffisante pour inhiber la forme activée de ras. Il est aussi possible que ras active

d'autres voies de signalisations que la voie activant Mek afin d'influencer la transcription de pS2. Cependant, il est possible que la dépendance vis-à-vis de la voie Mek est plus grande dans la lignée cellulaire RasV12 que dans la lignée ErbB2 pour l'activation de la transcription par ER. Il est possible que malgré des effets transcriptionnels similaires, ErbB2 et RasV12 semblent activer des voies de signalisation différentes pour moduler l'expression de pS2. On sait que Akt est plus actif dans la lignée ErbB2, il serait donc possible que la voie PI 3-kinase activée par ErbB2 puisse activer le récepteur des estrogènes malgré l'inhibition de la voie des MAP kinases.

### **6.2.3-La voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk est essentielle pour l'activation de la transcription de cMyc par la surexpression de ErbB2**

En 10c nous pouvons voir l'effet de l'inhibition de Mek sur la transcription de cMyc sous le contrôle d'un site AP-1 dans la lignée ErbB2 et la lignée contrôle AP2. L'inhibiteur U0126 n'a pas d'effet sur la transcription du gène cMyc dans la lignée contrôle. Par contre l'inhibition de Mek a un effet drastique sur l'expression de cMyc dans la lignée ErbB2. L'expression de cMyc est augmentée dans la lignée ErbB2 comparé à la lignée contrôle. L'expression du messenger de cMyc dans la lignée ErbB2 est supérieur de 1,5 à 2 fois à l'expression dans la lignée AP2. Lorsque les cellules de la lignée ErbB2 sont cultivées avec l'inhibiteur de Mek U0126, les niveaux d'expression de cMyc redeviennent égaux aux niveaux de la lignée contrôle sous toutes les conditions. Ceci montre que l'activation de Mek par ErbB2 est nécessaire à l'augmentation de l'expression de l'oncogène cMyc et seule cette voie de signalisation intracellulaire est impliquée dans ce phénomène.

La figure 19c nous montre que l'inhibition de Mek par le composé U0126 annule presque complètement l'effet de RasV12 sur la transcription de cMyc. Tel qu'observé en 16c, la lignée RasV12 augmente de manière générale la transcription du gène cMyc. Il est possible en 19c de voir que le traitement des cellules RasV12 avec l'inhibiteur de Mek U0126 réduit les niveaux d'expression de cMyc à des niveaux similaires aux niveaux observés dans la lignée contrôle sous les mêmes conditions. Les niveaux de base et stimulés au tamoxifène des cellules RasV12 sont identiques aux niveaux des

cellules pBabe pour ces mêmes traitements. Les niveaux d'expression de cMyc dans la lignée RasV12 en présence d'estradiol ou de ICI sont seulement supérieurs de 1,3 fois aux niveaux observés dans la lignée pBabe.

Nous pouvons conclure que l'activité de Mek est essentielle pour l'effet positif exercé par ErbB2 et RasV12 sur l'expression du gène cMyc.

#### **6.2.4-ErbB2 et RasV12 inhibent la transcription du gène PR en activant la voie des MAP kinases**

La figure 18b nous montre que l'inhibition de Mek permet la restauration de l'activation de la transcription du gène PR par E2 dans la lignée ErbB2 à un niveau similaire à la lignée contrôle. Nous pouvons conclure que l'effet répressif observé sur la transcription de PR dans la lignée ErbB2 est causé par l'activation de la voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk par la surexpression de l'oncogène ErbB2.

Nous avons précédemment démontré que la transcription du gène PR était fortement diminuée dans la lignée RasV12 (Fig. 16c). La figure 19b nous montre clairement que l'inhibition de Mek restaure la transcription de PR à des niveaux similaires à ceux observés dans les cellules contrôles. Le niveau de base du messager de PR des cellules RasV12 en présence de U0126 est par contre moins élevé que le niveau de base des cellules pBabe sous les mêmes conditions. Il est possible qu'une faible population de la protéine Mek ne soit pas inhibée par le composé U0126 et que cette population active résiduelle agisse sur l'expression de PR en absence de ligand de ER tel E2 ou tamoxifène.

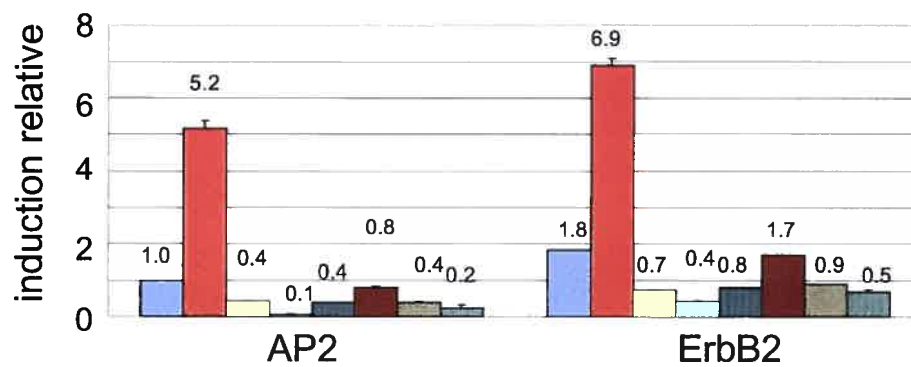
Tel que mentionné plus tôt, l'effet inhibiteur sur la transcription de PR est causée par l'activation de l'effecteur de la voie des MAP kinases Mek1/2. Nous démontrons que ErbB2 et RasV12 médient l'inhibition de PR par l'activation de cette kinase.

**Figure 18: Les effets transcriptionnels de ErbB2 sur les gènes cibles du ER nécessitent en parti l'activité de la kinase Mek**

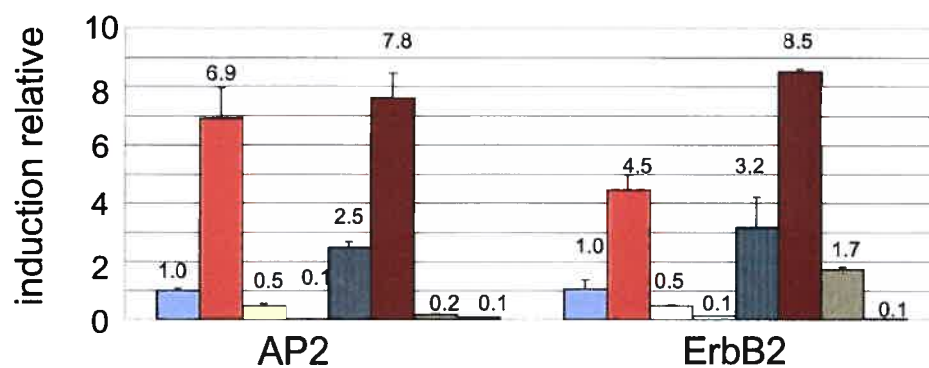
3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules contrôles (AP2) et surexprimant ErbB2 (ErbB2) ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénol contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum, prétraitées 1h (A,B) ou 18h (C) avec ou sans l'inhibiteur de Mek U0126. Les cellules ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$  M estradiol (E2),  $10^{-6}$  M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$  M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2 $\mu$ g d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>tm</sup> comme sonde ont ensuite été réalisées. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 2 fois (n=2) ou 1 fois n=1(B,C). Les figures présentées sont faites à partir d'un résultat unique représentatif.

Figure 18

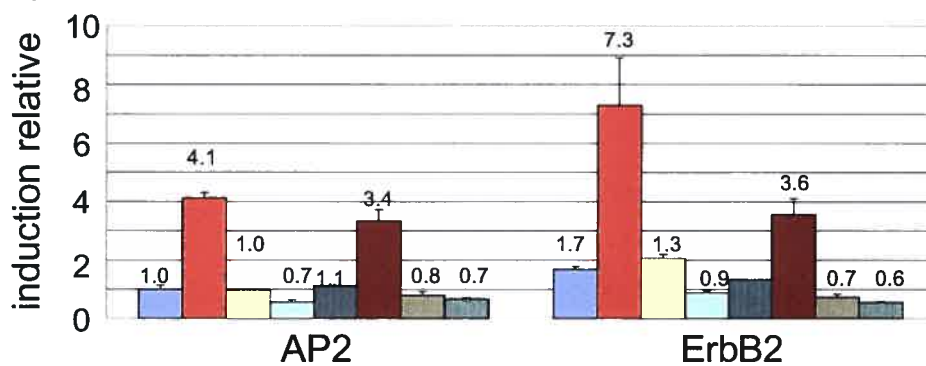
## A. pS2



## B. PR



## C. cMyc



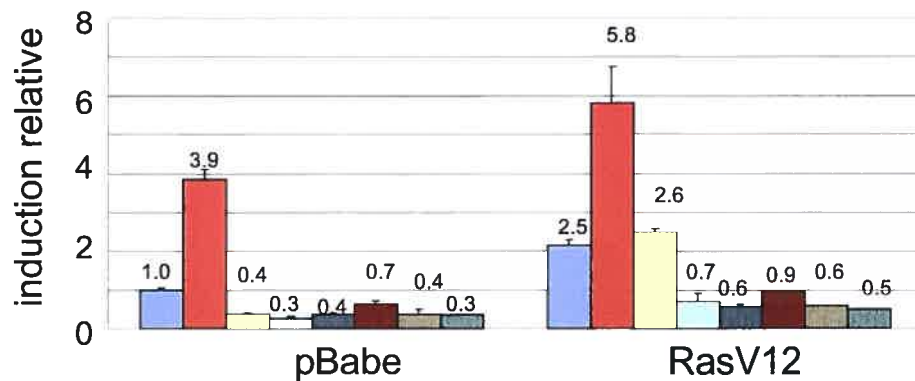
■ 0 
 ■ E2 
 ■ Tam 
 ■ ICI 
 ■ U0126

**Figure 19: RasV12 module la transcription des gènes cibles du ER au travers la kinase Mek**

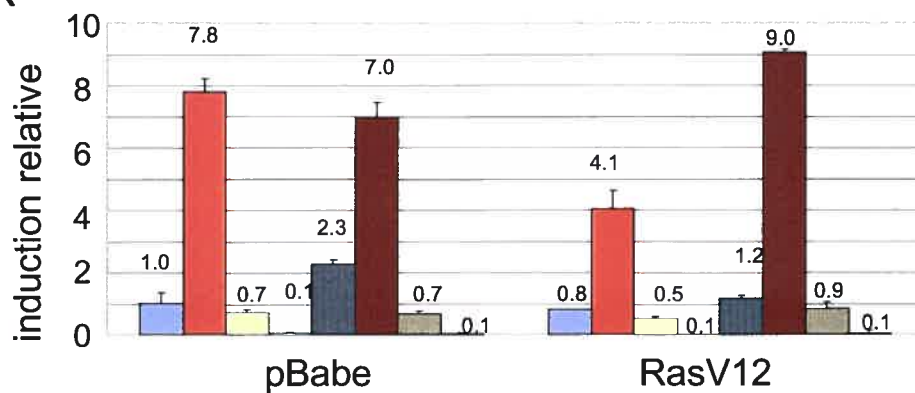
3 gènes sous le contrôle transcriptionnel de différents types de ERE, pS2/ERE (A), PR/ERE-SP1 (B) et cm/AP-1 (C) ont été étudiés par méthode de RT-PCR. Les cellules contrôles (pBabe) et surexprimant la forme constitutivement active de Ras (RasV12) ont été mises en culture 2 jours dans du milieu DMEM sans phénol contenant 10% de FBS traité au charbon afin que les cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant pas de composés stéroïdiens. Les cellules ont été ensuite cultivées ~18h en absence de sérum, prétraitées 1h (A,B) ou 18h (C) avec ou sans l'inhibiteur de Mek U0126. Les cellules ont ensuite été traitées  $2,5 \times 10^{-8}$ M estradiol (E2),  $10^{-6}$ M tamoxifène (Tam),  $10^{-7}$ M ICI182,780 (ICI) solubilisés dans de l'éthanol pendant 48h (A,B) et 2h (C). 2 $\mu$ g d'ARN extrait par trizol a ensuite été utilisé pour faire une transcription reverse pour générer une banque de cDNA. Des PCR en temps réel utilisant le SYBRgreen<sup>™</sup> comme sonde ont ensuite été performés. Les données brutes d'expression sont normalisées avec les niveaux d'expression du gène de ménage p36B4. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 2 fois (n=2) (A) ou 1 fois n=1(B,C). Les figures présentées sont faites à partir d'un résultat unique représentatif.

Figure 19

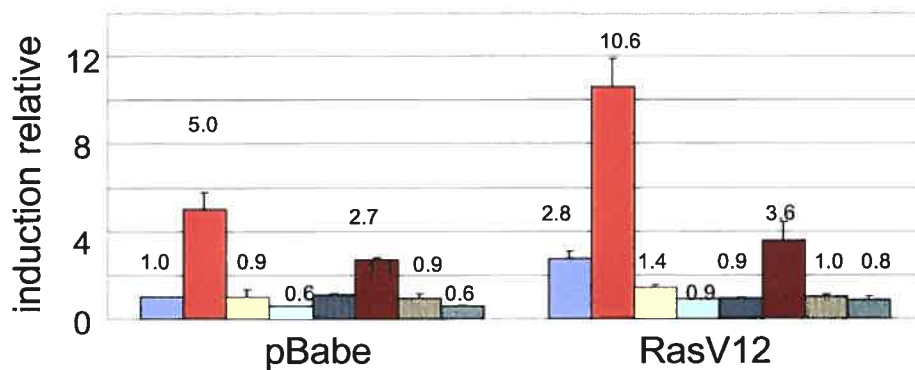
## A. pS2



## B. PR



## C. cMyc



0 E2 Tam ICI U0126



**Chapitre V: DISCUSSION**

## **1-Validation du modèle de surexpression de ErbB2 dans les carcinomes mammaires humains**

Un des objectifs de générer un modèle alternatif à celui principalement utilisé pour l'étude de la surexpression de ErbB2 dans les carcinomes mammaires était valide. La plupart des données non-cliniques disponibles sur l'effet de la surexpression de ErbB2 ont été obtenues à partir du modèle généré par Benz en 1992. Ce modèle est une lignée cellulaire MCF-7 surexprimant HER2/ErbB2 générée par transfection stable du cDNA de ErbB2. Cette lignée clonale MCF-7/HER2-18 exprime 45 fois plus ErbB2 que la lignée contrôle MCF-7/Neo (Benz, Scott et al. 1993). Nous voulions donc déterminer si les différences entre cette lignée clonale et la lignée contrôle étaient bien causées par la surexpression de ErbB2 et non par un artéfact acquis lors de la sélection clonale des cellules MCF-7/HER2-18 et MCF-7/Neo. Afin de déterminer si ces effets étaient représentatifs de la réalité, nous avons généré une lignée cellulaire formée à partir d'une population de cellules transfectées de manière stable avec le cDNA du gène de ErbB2.

### **1.2-Validation de l'influence de ErbB2 sur la croissance cellulaire**

Les cellules MCF-7/Her2-18 prolifèrent plus rapidement en présence d'estrogènes et de tamoxifène lorsque transplantées dans une lignée de souris athymiques (Benz, Scott et al. 1993; Liu, el-Ashry et al. 1995). Cette lignée ne peut par contre pas proliférer *in vivo* en absence d'estrogènes (Shou, Massarweh et al. 2004) contrairement à notre lignée ErbB2. Il faut par contre prendre note que nos expériences de prolifération cellulaires sont exécutées *in vitro*, dans un système relativement pur. Nous ne pouvons pas comparer le comportement d'un type cellulaire dans un organisme avec le comportement d'un autre dans un pétri. Des données générées à partir d'un autre modèle de MCF-7 transfecté avec ErbB2 démontrent, tout comme les nôtres, que la surexpression de ErbB2 dans une lignée de carcinome mammaire sensible aux estrogènes confère une indépendance aux hormones *in vitro* (Pietras, Arboleda et al. 1995).

Nos données s'accordent avec les données générées à partir de la lignée MCF-7/HER2-18 concernant la résistance au tamoxifène. Kurokawa et al. démontrent que ces cellules forment 3 fois plus de colonies dans l'agar mou que les cellules contrôle ne

surexprimant pas ErbB2 (Kurokawa, Lenferink et al. 2000). La prolifération de notre lignée ErbB2 est aussi augmentée en présence de tamoxifène comparé à la lignée contrôle AP-2, mais l'augmentation n'est que de 1,75 (Fig. 13a), ce qui résulte probablement de l'hétérogénéité de la population. Nous avons de plus observé que la surexpression de ErbB2 n'entraînait pas la baisse des niveaux d'expression du ER $\alpha$  dans les cellules MCF-7. Les données cliniques montrent une corrélation inverse entre l'expression du ER $\alpha$  et l'expression de ErbB2. Nos résultats suggèrent que la surexpression de ErbB2 n'a pas d'influence sur la présence du ER $\alpha$  et que la disparition de celui-ci serait liée à un autre processus cellulaire.

### **1.3-Validation de l'influence de ErbB2 sur l'expression génique dépendante du récepteur des estrogènes**

Kurokawa et al. (Kurokawa, Lenferink et al. 2000) ont évalués le comportement de l'expression d'un gène rapporteur sous le contrôle transcriptionnel d'éléments de réponse aux estrogènes classique (ERE). La surexpression de ErbB2 dans leur modèle augmente la transcription du gène luciférase d'un facteur de 3,5 par rapport à la lignée contrôle. Notre lignée ErbB2 exhibe tant qu'à elle une induction de 1,6 fois l'expression du gène luciférase sous le contrôle transcriptionnel de 3 ERE co-transfecté avec ER $\alpha$ . Les niveaux d'induction en présence de tamoxifène de lignées MCF-7/HER2-18 et Erb2 sont par contre comparables.

Comme pour la prolifération cellulaire, les effets de la surexpression de ErbB2 sur la transcription dans les clones HER2-18 et la population ErbB2 diffèrent quant à leur amplitude. Ceci est probablement lié au fait que notre lignée ErbB2 est une population de cellules surexprimant ErbB2, certaines fortement, d'autres faiblement. Il pourrait y avoir une dilution de l'effet dans la population comparé à la lignée clonale où toutes les cellules expriment 45 fois plus de récepteurs que les cellules de la lignée contrôle. Il est aussi possible que des mutations supplémentaires soient survenues lors de la sélection clonale dans le gène ErbB2 ou dans d'autres gènes affectant la prolifération cellulaire.

Nous pouvons conclure que notre population de cellules MCF-7 surexprimant ErbB2 agit de manière similaire aux clones HER2-18 ayant été étudié extensivement dans la littérature, et que la surexpression de ErbB2 est suffisante pour conduire à une prolifération accrue et une transactivation augmentée des gènes cibles des estrogènes.

## **2-Effets de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression génétique de cellules de carcinomes mammaires MCF-7**

Nos expériences de prolifération cellulaire (Fig.13) confirment que la surexpression de l'oncogène ErbB2/Her2/neu dans des cellules de carcinomes mammaires MCF-7 confère un avantage prolifératif par rapport aux cellules de même souche parentale ne surexprimant pas ce gène. Ces résultats sont conformes aux données cliniques montrant que des cellules cancéreuses ER positives surexprimant ErbB2 sont peu ou moins sensibles à l'antiestrogène tamoxifène (Ferrero-Pous, Hacene et al. 2000). L'expression de RasV12 dans les cellules MCF-7 confère aussi un avantage prolifératif à ces cellules. Le patron de prolifération sous différents traitements à l'estradiol ou aux antiestrogènes partiels ou complets tamoxifène et ICI 382,780 est très similaire entre les lignées cellulaires ErbB2 et RasV12. Cette similarité porte à supposer que les effets de ErbB2 sur la prolifération cellulaire seraient probablement effectués par des effecteurs des voies de signalisation intracellulaires activés par Ras.

L'effet stimulateur de l'estradiol sur la prolifération cellulaire dans les lignées ErbB2 et RasV12 est moins fort que dans les lignées contrôles AP2 et pBabe (1,2 contre environ 1,6). Cette atténuation pourrait suggérer que ErbB2 et RasV12 utilisent des mécanismes indépendants du récepteur des estrogènes pour activer la prolifération cellulaire. Une autre indication que ces mécanismes peuvent être indépendants du ER $\alpha$  est l'augmentation de la prolifération des cellules de lignées ErbB2 et RasV12 observée en présence de ICI. Ce composé, lorsque lié au récepteur des estrogènes, inhibe sa dimérisation et entraîne sa dégradation. Le récepteur étant donc dégradé, il ne peut plus agir sur la croissance cellulaire. Il faut par contre noter que la surexpression des oncogènes ErbB2 et RasV12 n'abolit pas complètement les effets répressifs exercés sur la prolifération cellulaire par les antiestrogènes tamoxifène et ICI. Ceci implique que le

récepteur des estrogènes joue toujours un rôle dans la prolifération de ces lignées cellulaires.

L'étude de l'influence exercée par ErbB2 et RasV12 sur l'expression de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'éléments de réponse aux estrogènes nous illustre aussi la propriété qu'ont ces 2 oncogènes d'influencer la cellule de manière indépendante et dépendante du ER $\alpha$ . Les études de transactivation avec gènes rapporteurs (Fig. 10) montre que la surexpression de ErbB2 dans les cellules HEK 293 peut augmenter la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle transcriptionnel de 3 ERE de manière dépendante au ER $\alpha$  (Fig.10a) tandis qu'elle peut influencer la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle transcriptionnel de 6 éléments TRE/AP-1 de manière indépendante du ER $\alpha$  (Fig. 10b, 10c).

### **2.1-Mécanismes d'action des effets dépendants du ER $\alpha$ de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression de gènes cibles: Rôle de AF-1**

Bien que nous ayons observé qu'une grande partie des effets prolifératifs de ErbB2 et RasV12 semblent être indépendants du ER $\alpha$ , la réponse aux antiestrogènes suggère que ER $\alpha$  a toujours un rôle à jouer dans la prolifération cellulaire. De plus, la capacité qu'a ErbB2 d'augmenter la transcription de gènes sous le contrôle d'un ERE en absence de traitement, en présence d'agoniste ou d'antagoniste partiel sans influencer la transcription en présence d'antagoniste complet (Fig. 10a) suggère que les effets de ErbB2 sur un ERE soient dépendants du ER.

Le récepteur des estrogènes alpha est une phosphoprotéine pouvant être phosphorylée par plusieurs kinases (Lannigan 2003). Tel qu'observé dans la figure 12, RasV12 peut activer la voie Ras/Raf/Erk tandis que ErbB2 active les voies Ras/Raf/Erk et PI 3-kinase/Akt. Les effecteurs de la voie MAP kinase Erk1/2 et pp90<sup>RSK</sup> peuvent phosphoryler le ER $\alpha$  *in vivo* sur les sérines 118 et 167 respectivement, activant ainsi la fonction d'activation ligand indépendante AF-1. Une protéine effectrice de la voie des PI3/kinases, Akt, peut aussi phosphoryler *in vivo* la serine 167 du ER $\alpha$ . L'effet positif de la surexpression de ErbB2 et de RasV12 sur la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'un ou de plusieurs ERE pourrait être causé par la phosphorylation et

l'activation du récepteur des estrogènes alpha indépendamment du ligand par Erk, pp90<sup>RSK</sup> ou Akt. Nous avons montré par immunobuvardage de type western que la serine 118 du ER $\alpha$  est plus fortement phosphorylée dans les lignées ErbB2 et RasV12. La phosphorylation de cette sérine, en conjonction avec la phosphorylation possible de la serine 167 par Akt fortement activée dans la lignée ErbB2 pourrait activer la transcription en absence de ligand en activant le domaine AF-1 et augmenter l'expression sous traitement E2 en agissant de manière coopérative avec la fonction AF-2 dépendante du ligand. L'antagoniste partiel tamoxifène inhibe l'activité transcriptionnelle du ER en liant le LBD du récepteur et en induisant une conformation réfractaire au recrutement de coactivateurs au domaine AF-2. La surexpression de ErbB2 et la présence de RasV12 pourraient compenser l'inhibition de la fonction AF-2 par le tamoxifène en activant le domaine AF-1 ligand-indépendant du ER $\alpha$ . Il a été démontré que l'activation maximale du domaine AF-1 du récepteur des estrogènes alpha pouvait induire la prolifération de cellules MCF-7 (Fujita, Kobayashi et al. 2003). Il est donc probable que l'activation de la fonction AF-1 par phosphorylation contribue à augmenter la prolifération cellulaire dans les lignées ErbB2 et RasV12 capables d'activer diverses kinases ayant le domaine AF-1 de ER $\alpha$  comme cible.

La voie des MAP kinases peut aussi phosphoryler des coactivateurs de la famille des p160 (Font de Mora and Brown 2000; Rowan, Weigel et al. 2000; Lopez, Turck et al. 2001). L'activation de cette voie par ErbB2 et RasV12 pourrait aussi augmenter l'activité de ces coactivateurs et collaborer à l'effet positif sur la transcription de ErbB2 et RasV12 de gènes cibles du ER.

Nous avons montré que l'inhibition d'un membre de la cascade d'activation de la voie MAP kinase Ras/Raf/Erk jouait un rôle essentiel dans l'induction de la transcription de pS2 par RasV12. A la lumière de ces données préliminaires et des westerns blots de la figure 12 nous pouvons conclure que RasV12 active probablement la fonction transcriptionnelle du ER $\alpha$  en phosphorylant le récepteur au niveau de la sérine 118 par l'activation de Erk. Ceci pourrait être confirmé avec des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine en utilisant un anticorps dirigé contre la sérine 118 phosphorylée du ER $\alpha$ . ErbB2 ne semble pas avoir besoin de l'activité de Erk pour activer la transcription de pS2. Il est possible que la voie des PI 3-kinase ait un rôle à

jouer car cette voie est activée dans la lignée ErbB2 sans l'être dans la lignée RasV12. Pour confirmer cette hypothèse, nous devrions étudier le patron d'expression de pS2 en présence d'un inhibiteur de la voie des PI 3-kinase.

## **2.2- Mécanismes d'action des effets indépendants du ER $\alpha$ de ErbB2 et RasV12 sur la prolifération cellulaire et l'expression de gènes cibles**

Les effets positifs de ErbB2 et de RasV12 sur la prolifération cellulaire en présence de l'antiestrogène complet ICI ainsi que l'atténuation de la réponse aux estrogènes dans ces lignées peuvent suggérer que ErbB2 et RasV12 exercent leur influence mitogéniques indépendamment du récepteur des estrogènes. Nous avons déterminé que les lignées ErbB2 et RasV12 démontrent une activité accrue de certaines voies de signalisation intracellulaires par rapport aux lignées contrôle. Ces voies (Ras/Raf MAPK et PI 3-kinase) peuvent influencer positivement l'activité du ER, mais peuvent aussi influencer une foule d'autres protéines régulatrices de diverses fonctions cellulaires telles que l'apoptose, la croissance et la prolifération cellulaire.

### **2.2.1-Mécanismes indépendants du ER $\alpha$ : Rôle potentiel de AP-1**

Le groupe du Dr Kushner a proposé que l'activité proliférative/mitogénique des estrogènes serait régie par l'activation de l'expression de gènes cibles sous le contrôle du facteur de transcription AP-1. L'inhibition des protéines formant AP-1 bloque les effets mitogéniques des facteurs de croissance ainsi que la croissance de cellules de cancer du sein (Liu, Ludes-Meyers et al. 2002). Deux gènes cibles de AP-1 sont cruciaux pour la progression du cycle cellulaire: La cycline D1 et cMyc. Cycline D1 a un rôle crucial dans la progression de l'étape G1 du cycle cellulaire. Le complexe cyclineD1/Cdk4/6 va phosphoryler la protéine Rb (Ewen 2000). Rb séquestre le facteur de transcription E2F. La phosphorylation de Rb permet le relâchement de E2F, et celui-ci peut alors accéder à l'ADN pour activer la transcription de gènes reliés à la progression du cycle cellulaire. cMyc permet la transcription de gènes essentiels à la prolifération cellulaire et a un rôle dans la transition G1/S.

Il est donc très probable que ErbB2, un récepteur de facteurs de croissance épithéliaux, exerce son effet sur la prolifération cellulaire en activant AP-1. Les données d'expression de cMyc (Fig.15c, Fig.16c) prises en considération avec les données obtenues en essais gènes rapporteurs (Fig.10b, c) suggèrent que l'effet de ErbB2 et de RasV12 sur un élément de réponse au facteur AP-1 soient indépendants du ER. AP-1 est composé des protéines de la famille Jun et Fos. L'activité transcriptionnelle du facteur de transcription AP-1 est régulée par les voies des MAP kinases Ras/Raf/Erk, JNK et p38 MAP kinase. Erk augmente l'activité de AP-1 en phosphorylant le facteur de transcription Elk qui lie le promoteur et active la transcription du gène cFos. Jun peut aussi être phosphorylé *in vivo* par JNK qui est peut être activé par la voie Ras. Comme mentionné plus tôt, Erk est fortement activé dans les lignées ErbB2 et RasV12. Ceci montre que ErbB2 et RasV12 peuvent activer la transcription de gènes sous AP-1 indépendamment du ER. Un autre élément appuie l'argument que les effets positifs de ErbB2 et RasV12 sur un gène contrôlé par un AP-1 sont indépendants de l'expression du ER $\alpha$ . Lors des expériences de transactivation avec un élément rapporteur AP1<sub>6</sub>-EBV-CAT dans les cellules de lignée HEK-293 ER négatives, la co-transfection de ER $\alpha$  n'augmente pas la transcription du gène rapporteur en présence ou en absence de ErbB2. Si ER $\alpha$  avait eu un rôle à jouer dans l'activation de AP-1 par ErbB2, la co-transfection du ER $\alpha$  aurait agi de manière synergique avec AP-1 en présence de ErbB2 car, comme pour le cas des ERE, ER $\alpha$  aurait été actif en absence de ligand et aurait pu augmenter la transcription du gène rapporteur CAT. Ceci démontre que le récepteur des estrogènes n'est pas nécessaire à l'augmentation de la transcription d'un gène sous le contrôle d'un TRE/AP-1 par ErbB2. Un autre moyen qu'auraient ErbB2 et RasV12 d'augmenter la transcription d'un gène sous le contrôle d'un site AP-1 serait par l'activation de JNK. Cette kinase phosphoryle c-Jun et augmente son activité transcriptionnelle. L'utilisation de l'inhibiteur de Mek lors de l'étude du patron de l'expression de cMyc nous montre par contre que l'activation de AP-1 par ErbB2 et RasV12 dépend uniquement de l'activité de Mek et par conséquent de la MAP kinase Erk et non la MAP kinase JNK.



### 2.2.1.1-Mécanismes indépendants du ER $\alpha$ : Rôle potentiel de cMyc

cMyc est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la transcription de gènes essentiels pour la prolifération cellulaire (Zhang and Liu 2002). La coexpression de cMyc et de Ras permet l'induction de l'activité kinase dépendante de la cycline E menant au démarrage de la phase S (Leone, DeGregori et al. 1997). La protéine cMyc, en plus de promouvoir la transcription de gènes associés à la prolifération cellulaire, peut s'associer avec la protéine p27<sup>kip1</sup>. p27<sup>kip1</sup> séquestre Cyclcine E/Cdk2, inhibe leur activité et bloque la transition G1/S. cMyc s'associe au complexe p27<sup>kip1</sup>/cyclineE/Cdk2 et facilite la phosphorylation de p27<sup>kip1</sup> qui augmente sa dégradation.

Il est possible que l'activation de la transcription de gènes associés à la prolifération sous le contrôle de sites AP-1 comme cMyc par ErbB2 et RasV12 leur permettent d'activer la prolifération cellulaire de manière indépendante du ER. cMyc est un gène cible de ER et de la voie des MAP kinases Raf/Erk. Ceci implique que ErbB2 et ER $\alpha$  utiliseraient les mêmes voies transcriptionnelles afin de promouvoir la prolifération cellulaire. Il a été suggéré que l'effet proliférateur des estrogènes se ferait par l'activation non-génomique de la voie Erk plutôt que par la régulation de gènes cibles (Moggs and Orphanides 2001; Zhang, Kumar et al. 2004). Cette proposition reste controversée.

### 2.3-Mécanismes d'atténuation de l'effet inducteur de l'estradiol sur la transcription et la prolifération

Nos expériences de prolifération cellulaire nous montrent que l'estradiol induit moins la prolifération cellulaire des lignées ErbB2 et RasV12 que celle des lignées contrôles AP2 et pBabe comparé aux niveaux de prolifération de base. De plus, la capacité de l'estradiol à induire l'expression des gènes cibles du ER pS2 et cMyc est légèrement diminuée (de 15 et 25% respectivement) dans la lignée RasV12 comparée à la lignée contrôle. Nous pourrions supposer que ces données indiquent une indépendance des estrogènes pour la modulation de la transcription par RasV12 et la stimulation de la croissance par ErbB2 et RasV12. La diminution de l'effet des

estrogènes dans les lignées cellulaires surexprimant ErbB2 et RasV12 pourrait aussi suggérer que ces trois facteurs agissent sur les mêmes voies cellulaires. Certains effecteurs cellulaires étant déjà activés par ErbB2 et RasV12, l'ajout d'hormones estrogéniques ne pourrait plus augmenter leur activité, ce qui pourrait se traduire par une diminution de l'efficacité des estrogènes dans les lignées cellulaires surexprimant ces oncogènes.

### **2.3.1-Mécanismes d'atténuation des effets inducteurs de l'estradiol: Rôle de AF-1**

L'activité du récepteur des estrogènes alpha peut être modulée par la phosphorylation de son domaine AF-1 par diverses kinases (Lannigan 2003). Nous avons établi que Erk est plus actif et que la sérine en position 118 du ER $\alpha$  est plus phosphorylée dans les lignées ErbB2 et RasV12 que dans les lignées contrôles AP2 et pBabe (Fig. 12). Tel que mentionné dans la section 2.1, l'activation de AF-1 est un mécanisme pouvant expliquer les effets de ErbB2 et RasV12 sur la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE.

Ras active la voie des MAP kinases aboutissant en l'activation de Erk. Erk a la propriété de phosphoryler les sérines en positions 104, 106 et 118 du ER $\alpha$ . La liaison de l'estradiol au LBD du ER $\alpha$  permet aussi la phosphorylation de la sérine en position 118 par CDK7/TFIIH. Il serait possible qu'en absence d'hormones, les niveaux de phosphorylation de la sérine 118 du ER $\alpha$  serait maximaux dans la lignée RasV12, ce qui se traduit en augmentation significative du niveau basal de transcription (Fig. 16a). L'estradiol se liant au ER $\alpha$  dans cette lignée cellulaire activerait le domaine d'activation AF-2 en réorientant l'hélice 12 et en permettant le recrutement de coactivateurs AF-2 dépendant mais ne pourrait pas augmenter l'activité du domaine AF-1 car la sérine 118 aurait déjà été phosphorylée par Erk. L'estradiol pourrait donc toujours activer ER $\alpha$ , mais seulement au travers de AF-2.

Nous pourrions vérifier cette hypothèse par immunobuvardage de type western sur la forme phosphorylée en position 118 du ER $\alpha$  et présence et en absence d'estradiol dans les lignées RasV12 et pBabe. Si l'estradiol n'augmente pas les niveaux de phosphorylation de la sérine 118 du ER $\alpha$  dans la lignée RasV12, ceci signifierait que cette sérine est phosphorylée de manière maximale dans la lignée RasV12 et que

l'atténuation de l'effet de l'estradiol est causée par son incapacité à augmenter l'activité de la fonction AF-1 dans la lignée RasV12.

### **2.3.2-Mécanismes d'atténuation des effets inducteurs de l'estradiol: Rôle des voies non-génomiques du ER $\alpha$**

Un autre niveau sur lequel le récepteur des estrogènes alpha, RasV12 et ErbB2 agissent est l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Le récepteur des estrogènes alpha a la capacité d'activer les voies de signalisations Raf/Erk MAP kinase et PI 3-kinase indépendamment de son activité au niveau du noyau.

ErbB2 et RasV12 activent la voie des MAP kinases Erk qui a un grand rôle dans la prolifération du cycle cellulaire. L'estradiol, en interagissant avec src, peut activer Ras (Migliaccio 1998). ErbB2 et RasV12 peuvent activer la prolifération cellulaire en activant les voies des MAP kinases, ce qui ferait augmenter la prolifération basale des cellules surexprimant ces oncogènes. Comme dans le cas de la fonction AF-1, l'ajout d'estradiol ne pourrait pas augmenter l'activation de la voie des MAP kinases déjà induite par ces oncogènes.

Nous pourrions vérifier cette hypothèse par immuobuvardage de type western. Nous pourrions étudier les formes phosphorylées de Erk et de Mek afin de voir si, dans les lignées ErbB2 et RasV12, le traitement à l'estradiol permet l'augmentation de la phosphorylation de cet effecteur de la voie Raf. Si les niveaux de phosphorylation ne changent pas dans ces lignées, tout en étant induits dans les lignées contrôles, ceci signifierait qu'un niveau d'induction maximal des voies aurait été atteint et que l'estradiol ne pourrait augmenter l'effet de ErbB2 et de RasV12.

Afin de déterminer si ErbB2 et l'estradiol agissent similairement sur l'induction des gènes de croissance nous pourrions effectuer des expériences de micropuces d'ADN. Nous pourrions comparer les gènes induits par l'oncogène ErbB2 et par l'estradiol et déterminer si certains gènes clés pour la progression du cycle cellulaire seraient induits de manière similaire.

### **3-Surexpression de ErbB2 et résistance au tamoxifène**

Nos expériences de prolifération cellulaire (fig.13) confirment que la surexpression de l'oncogène ErbB2/Her2/neu dans des cellules de carcinomes mammaires MCF-7 confère un avantage prolifératif sur les cellules de même souche parentale ne surexprimant pas ce gène. Ces résultats sont conformes aux données cliniques montrant que des cellules cancéreuses ER positives surexprimant ErbB2 sont peu ou moins sensibles à l'antiestrogène tamoxifène (Ferrero-Pous, Hacene et al. 2000).

Nos résultats confirment aussi le rôle important que joue ErbB2 dans l'adaptation entreprise par les cellules MCF-7 afin de pouvoir survivre et croître en présence constante de tamoxifène. En effet, les cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène (Tam-r) développées par Nicholson et al. (Knowlden, Hutcheson et al. 2003) ont, tout comme notre lignée ErbB2, un plus haut taux protéique de ErbB2 et de ErbB2 actif (phosphorylé) à la membrane que les cellules parentales MCF-7 sensibles au tamoxifène.

Nos données contredisent par contre ces mêmes résultats qui stipulent que la surexpression de ErbB2 confère une résistance au tamoxifène. Nous pouvons observer que les niveaux de croissance des cellules ErbB2 sous traitement tamoxifène sont inférieurs aux niveaux de prolifération en absence d'hormone et d'anti-hormone. Ceci démontre que la lignée ErbB2 est toujours sensible aux effets antiprolifératifs du tamoxifène. Par contre, la prolifération des cellules ErbB2 sous tamoxifène est presque égale au niveau de prolifération des cellules contrôles en présence de E2. La surexpression de ErbB2 augmente donc la prolifération cellulaire d'une manière telle que les effets antiprolifératifs du tamoxifène ne permettent pas de revenir à un niveau de prolifération comparable à celui de la lignée parentale.

### **4-Rôle de ErbB2 dans le phénomène de résistance aux antiestrogènes totaux et aux inhibiteurs d'aromatase**

Beaucoup de travail a été dédié à la caractérisation du rôle de ErbB2 dans le phénomène de résistance au tamoxifène, mais peu de données sont disponibles sur l'effet de ErbB2 sur d'autres composés utilisés dans la thérapie du cancer du sein. 2 types de composés ont dernièrement fait leur apparition dans le domaine du traitement du cancer

du sein: les inhibiteurs d'aromatase (letrozole<sup>™</sup>) et les antiestrogènes totaux (faslodex<sup>™</sup>/ICI182,780). Le letrozole inhibe l'enzyme aromatase qui permet de convertir certains stéroïdes en estradiol créant ainsi un environnement sans estradiol (Brueggemeier 2004) et inhibe par le même fait la croissance des cellules cancéreuses ER<sup>+</sup> dépendantes des estrogènes. Le ICI182,780 est un antiestrogène complet liant ER comme antagoniste et pouvant inhiber la dimérisation entraîner sa dégradation (Parker 1993). Tel que vu dans la figure 13a, les cellules ErbB2 prolifèrent plus en absence de traitement ou en présence de ICI que les cellules contrôle sous les mêmes conditions.

#### **4.1-ErbB2 et mécanisme de résistance aux inhibiteurs d'aromatase**

Supposant que le milieu ne contenant pas d'hormone utilisé dans nos expériences s'apparente à un milieu privé d'estrogènes (causé par l'inhibition de l'aromatase), les cellules ErbB2 pourraient être considérées comme étant résistantes aux inhibiteurs d'aromatase. La capacité qu'ont les tumeurs mammaires surexprimant ErbB2 à résister au letrozole a déjà été observée dans une étude clinique incluant 907 femmes ayant différents niveaux sériques de HER-2/neu. Les patientes ayant des niveaux élevés de Her2/neu sérique étaient relativement résistantes à la thérapie par le letrozole (Lipton, Ali et al. 2003). Nos résultats sont aussi confirmés par les expériences faites sur les cellules MCF-7 LTED-H et LTED-I développées par Dowsett pouvant croître en absence d'estradiol. Ces deux types cellulaires, hypersensible à E2 (LTED-H) ou indépendant d'E2 (LTED-I), ont un plus haut niveau de ErbB2 et de phospho-ErbB2 que la lignée MCF-7 parentale. Ceci confirme nos résultats montrant que ErbB2 a un rôle à jouer dans le mécanisme d'indépendance proliférative à l'estradiol lorsque surexprimé dans une lignée de carcinome mammaire ER<sup>+</sup>.

La résistance au tamoxifène et l'indépendance vis à vis de E2 de la lignée ErbB2 pourraient s'expliquer par l'activation possible de la fonction ligand-indépendante (AF1) du récepteur des estrogènes alpha tel que décrite dans la section 2.1. La surexpression de ErbB2 pourrait compenser l'inactivité de AF2 en absence de ligand ou en présence d'inhibiteur en activant ER $\alpha$  par sa fonction AF1 entraînant ainsi une augmentation de la prolifération cellulaire.

#### 4.2-ErbB2 et résistance aux antiestrogènes totaux

Des cellules MCF-7 ayant été développées pour pouvoir à résister à une exposition constante au faslodex<sup>™</sup> (Sommer, Hoffmann et al. 2003) expriment environ quatre fois plus de p185HER2 que la lignée MCF-7 sauvage. Ceci valide nos expériences de prolifération cellulaire montrant que la lignée ErbB2 prolifèrent deux fois plus que la lignée AP2 sous traitement par ICI. Ce composé, lorsque lié au récepteur des oestrogènes inhibe sa dimérisation et entraîne sa dégradation. Le récepteur étant donc dégradé, il ne peut plus agir sur la croissance cellulaire. Nous observons par contre que la surexpression de ErbB2 augmente la prolifération cellulaire en présence de ICI, tout en ayant observé que ER $\alpha$  est toujours dégradé par le ICI dans les cellules surexprimant ErbB2 (données non montrées). Ce résultat nous montre que malgré l'activation possible du ER $\alpha$  par sa fonction AF1, ErbB2 aurait aussi un effet sur la prolifération cellulaire indépendant de la voie du récepteur des estrogènes.

#### 5-Influence négative de ErbB2 et RasV12 sur la transcription du gène PR

Contrairement à ce que nous nous attendions, la surexpression de ErbB2 et la présence de RasV12 n'augmentent pas l'expression du messenger de PR comme pour le messenger de pS2 (Fig.17b). Nardulli et al. ont découvert une séquence AP-1 (TGACTGA) dans la région +745 du gène PR à l'intérieur de laquelle se retrouve le demi-ERE imparfait (TGACT). Cette séquence AP-1, lorsque lié par les dimères Jun/Jun ou Jun/Fos, inhibe la transcription de PR. Ceci amène à stipuler que la liaison du ER $\alpha$  et de Fos/Jun au site +745 ont des effets opposés (Petz, Ziegler et al. 2004). La liaison de AP-1 au site +745 pourrait empêcher l'accès à l'ADN par ER $\alpha$ . Ces effets opposés seraient causés par la compétition entre AP-1 et ER $\alpha$  pour la liaison du même site sur l'ADN. Comme démontré dans la figure 12, Erk1/2 est plus activé dans les lignées ErbB2 et RasV12 que dans les lignées contrôle et il est connu que Erk1/2 peut augmenter l'activité de AP-1 en augmentant la transcription de c-Fos (Agarwal, Corbley et al. 1995). Grâce aux données obtenues avec l'étude de l'expression de AP1<sub>6</sub>-TATA-CAT et du gène cMyc, nous savons aussi que AP-1 est plus actif dans nos lignées ErbB2 et RasV12 que dans les lignées contrôles, ce qui pourrait aussi potentiellement augmenter l'activité de répression transcriptionnelle. AP-1 pourrait donc être plus

présent au site +745 de PR afin d'inhiber la transcription de ce gène en présence d'hormone en compétitionnant avec ER $\alpha$ .

En absence de traitement il pourrait y avoir une balance entre les signaux activateurs (Akt) et inhibiteurs (Erk) de la transcription de PR qui permettrait une expression similaire à la lignée contrôle. La présence de ICI augmente la dégradation du ER $\alpha$ , en présence de cet antiestrogène AP-1 n'aurait pas à compétitionner avec ER $\alpha$  et pourrait réprimer de manière maximum la transcription de PR. En absence de traitement, AP-1 dans la lignée ErbB2 pourrait inhiber la transcription basale de PR en empêchant la liaison de ER $\alpha$  non stimulé par E2 tandis que Akt pourrait phosphoryler ER $\alpha$  lui permettant une plus grande liaison ligand-indépendante au site +745 que dans la lignée contrôle. Ce modèle pourrait être vérifié par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). En immunoprécipitant le ER $\alpha$  et ses diverses formes phosphorylées ainsi que les composantes du facteur de transcription c-Jun et c-Fos à partir d'extraits cellulaires de cellules de lignées ErbB2, RasV12 ou contrôle sous diverses conditions (agonistes, antiestrogènes, inhibiteurs de voies intracellulaires, etc.) nous pourrions déterminer le patron de liaison du site +745 du promoteur du gène PR. Un autre demi ERE se retrouve à proximité du site AP-1 (+571) (Kastner, Krust et al. 1990). Il est possible que AP-1 et ER $\alpha$  ne compétitionnent pas pour un site commun, mais que l'activation de AP-1 ait toujours un effet répressif sur l'activité transcriptionnelle du ER $\alpha$  au site +571.

### **5.1- Implications cliniques de l'inhibition de l'expression de PR par ErbB2 et RasV12**

L'expression du gène PR dans une tumeur est considéré en clinique comme un bon indicateur de réponse aux antiestrogènes et de pronostic. Les patientes ayant des tumeurs ER<sup>+</sup> et PR<sup>+</sup> ont un meilleur pronostic de survie et de réponse aux SERMs que les patientes ayant des tumeurs ER<sup>+</sup> et PR<sup>-</sup>. L'induction de l'expression de PR sous traitement E2 ainsi que son inhibition par les antiestrogènes peuvent aussi être considérés comme indicateur d'un ER $\alpha$  fonctionnel (Sommer, Hoffmann et al. 2003). Nos données montrent que l'expression de PR en présence d'estradiol est inhibée par la surexpression de ErbB2. Le récepteur des estrogènes est par contre toujours fonctionnel car nous pouvons voir une réponse aux hormones et antihormones du gène pS2 dans la

lignée surexprimant ErbB2. Ces données nous suggèrent que PR ne serait pas le meilleur candidat à étudier pour déterminer la fonctionnalité du ER $\alpha$  dans les tumeurs mammaires. Par contre, sachant que l'activation de la voie des MAP kinases par ErbB2 ou d'autres facteurs inhibe l'expression de PR, l'absence ou la faible expression de PR dans des tumeurs mammaires en présence de hauts niveaux de pS2 pourrait être considérée comme un indicateur potentiel d'activation de la voie des MAP kinases Raf/Erk, ce qui pourrait fournir de précieuses indications concernant l'approche thérapeutique à utiliser pour traiter ces cancers.

### **6-Rôles de la voie Ras/Raf/Erk MAP kinase dans la modulation de l'activité du récepteur des estrogènes par ErbB2**

L'utilisation de U0126, un inhibiteur de Mek, la MAP kinase kinase effectrice de la voie Ras/Raf, nous a permis de déterminer les voies de signalisation essentielles aux effets de ErbB2 sur la fonction transcriptionnelle du récepteur des estrogènes.

Il semble que l'inhibition de Erk (par l'inactivation de Mek) n'abolit pas l'effet de ErbB2 sur l'augmentation de la transcription du gène pS2 dépendante du ER (Fig. 18a). L'activation de la transcription de ce gène sous le contrôle d'un ERE imparfait, par la surexpression de ErbB2 pourrait être médiée par l'activation de la voie PI-3 kinase. Tel que vu en figure 12, la protéine Akt est fortement phosphorylée dans la lignée ErbB2. Le patron d'expression de pS2 devra être étudié en présence d'un inhibiteur de la voie des PI 3-kinase pour confirmer cette hypothèse.

La surexpression de RasV12 dans la lignée MCF-7 entraîne des effets similaires sur la transcription de pS2, mais de manière complètement dépendante de la voie Ras/Raf/Erk. ErbB2 et RasV12 n'utilisent donc pas les mêmes moyens pour exercer un effet similaire sur la transcription d'un gène sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE.

Par contre, l'influence exercée par ErbB2 et RasV12 (négative pour PR et positive pour cMyc) sur la transcription de gènes sous le contrôle transcriptionnelle d'un site TRE/AP-1 semble dépendre uniquement de la voie des MAP kinases Ras/Raf/Erk. Nous avons démontré que cette influence est exercée par ErbB2 et RasV12 indépendamment du récepteur des estrogènes (Fig. 10b-c). La voie des PI-3 kinase n'affecte pas l'activité du facteur de transcription AP-1, il est donc normal que



l'inhibition de Mek inhibe complètement les effets de ErbB2 et de RasV12. L'activation plus élevée de Erk dans la lignée RasV12 que dans la lignée ErbB2 peut ici expliquer l'effet plus prononcé de RasV12 sur l'inhibition de l'expression de PR et l'activation de l'expression de cMyc.

## 7- Conclusion

Dans cette étude, nous avons confirmé que la surexpression de ErbB2 confère un avantage prolifératif aux cellules de carcinomes mammaires MCF-7 tel que précédemment démontré avec le modèle d'étude MCF-7/Her2-18 (Benz, Scott et al. 1993; Kurokawa, Lenferink et al. 2000; Shou, Massarweh et al. 2004). Nous confirmons que l'effet de ErbB2 sur la prolifération cellulaire et l'expression de pS2 n'est pas causé par un artefact de sélection clonale acquis lors de la génération de cette lignée. Nous démontrons de plus que la lignée ErbB2 acquiert une réponse moins grande aux estrogènes et peut proliférer en présence de l'antiestrogène total ICI 162,780 sans toutefois que les patrons d'expression de ER $\alpha$  ne soient affectés. Ces nouvelles données montrent que la surexpression de ErbB2 aurait un rôle potentiel dans le développement de la résistance à d'autres traitements du cancer du sein que le traitement par les SERMs.

Nous avons aussi démontré que la surexpression de ErbB2 augmente l'activité transcriptionnelle du récepteur des estrogènes sur le gène pS2 sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE. Cet effet n'est pas dépendant de la kinase Erk activée dans la lignée ErbB2 mais possiblement de l'activation de Akt, une kinase effectrice de la voie PI-3 kinase.

Un élément intéressant concernant l'étude des patrons d'expression de gènes cibles du ER lorsque ErbB2 est exprimé est l'influence négative qu'exerce ErbB2 sur la stimulation de l'expression de PR par l'estradiol. L'expression tumorale de PR sert de marqueur pour l'activité du récepteur des estrogènes alpha et l'absence de PR est considérée comme mauvais pronostic. L'expression de PR dans une tumeur négative est signe d'un mauvais pronostic de survie, tout comme la présence de ErbB2. La surexpression de ErbB2 dans des tumeurs mammaires ER positives pourrait conduire à

la génération de tumeurs ER+/PR- sans que l'activité du ER ne soit compromise. La présence de PR reste donc un bon indicateur de pronostic de survie, mais l'expression d'autres gènes devraient être examinés pour évaluer la fonctionnalité du ER $\alpha$ , mais les faibles niveaux de PR seraient indicateurs d'une activation de la voie Erk et probablement d'une plus grande capacité de croissance de ces tumeurs accompagnée d'une résistance partielle aux antiestrogènes.

Nous nous sommes de plus concentrés sur l'effet de la surexpression de ErbB2 sur la transcription de gènes cibles du ER sous le contrôle d'un élément de réponse aux estrogènes non-classique de type AP-1. La surexpression de ErbB2 augmente l'activité du facteur de transcription AP-1 de manière dépendante de la voie de signalisation intracellulaire Ras/Raf/Erk mais probablement indépendante du récepteur des estrogènes. Ceci amène de nouvelles données concernant le potentiel qu'a ErbB2 à conférer une résistance aux estrogènes aux cellules dans lequel ce gène est surexprimé. Il a été postulé que les effets mitogéniques du récepteur des estrogènes alpha sont effectués au travers de la transcription de gènes régulés par des sites TRE/AP-1 (Kushner, Agard et al. 2000). Cette hypothèse, en conjonction avec nos résultats nous permet de postuler que la résistance aux antiestrogènes conféré par ErbB2 pourrait s'opérer non pas par l'activation du domaine d'activation AF-1 indépendant du ligand du ER $\alpha$  à un site ERE, mais par l'activation directe de AP-1 indépendamment du récepteur des estrogènes.

Nous pouvons conclure que la surexpression de l'oncogène ErbB2 confère aux cellules de carcinomes mammaires un avantage prolifératif par rapport à des cellules ne surexprimant pas ce récepteur membranaire. Nous pouvons de plus conclure que ErbB2 augmente la transcription de gènes cibles du récepteur des estrogènes de manière dépendante au récepteur des estrogènes alpha pour des gènes sous le contrôle transcriptionnel d'un ERE et indépendante du ER $\alpha$  pour les gènes sous le contrôle transcriptionnel d'un TRE/AP-1. Les effets de ErbB2 sur ces deux types d'éléments de réponses sont gérés par deux vois de signalisation différentes. L'effet positif de ErbB2 sur la transcription dépendante d'un ERE nécessiterait possiblement l'activation de la

voie PI3-kinase et l'effet positif de ErbB2 sur le facteur de transcription AP-1 nécessite l'activation de la voie Ras/Raf/Erk.

## Biblio

- (1998). "Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group." Lancet **351**(9114): 1451-67.
- Abate, C., D. Luk, et al. (1990). "Fos and jun cooperate in transcriptional regulation via heterologous activation domains." Mol Cell Biol **10**(10): 5532-5.
- Acevedo, M. L. and W. L. Kraus (2003). "Mediator and p300/CBP-steroid receptor coactivator complexes have distinct roles, but function synergistically, during estrogen receptor alpha-dependent transcription with chromatin templates." Mol Cell Biol **23**(1): 335-48.
- Agarwal, S., M. J. Corbley, et al. (1995). "Reconstitution of signal transduction from the membrane to the nucleus in a baculovirus expression system: activation of Raf-1 leads to hypermodification of c-jun and c-fos via multiple pathways." Oncogene **11**(3): 427-38.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, et al. (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J **15**(23): 6541-51.
- Ali, S., D. Metzger, et al. (1993). "Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region." Embo J **12**(3): 1153-60.
- Anzai, Y., C. F. Holinka, et al. (1989). "Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line)." Cancer Res **49**(9): 2362-5.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-304.
- Arias, J., A. S. Alberts, et al. (1994). "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor." Nature **370**(6486): 226-9.
- Barsalou, A., W. Gao, et al. (1998). "Estrogen response elements can mediate agonist activity of anti-estrogens in human endometrial Ishikawa cells." J Biol Chem **273**(27): 17138-46.
- Belandia, B., R. L. Orford, et al. (2002). "Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes." Embo J **21**(15): 4094-103.
- Benz, C. C., G. K. Scott, et al. (1993). "Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu." Breast Cancer Res Treat **24**(2): 85-95.
- Bergman, L., M. L. Beelen, et al. (2000). "Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres' ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen." Lancet **356**(9233): 881-7.
- Berstein, L. M., H. Zheng, et al. (2003). "New approaches to the understanding of tamoxifen action and resistance." Endocr Relat Cancer **10**(2): 267-77.
- Bourdeau, V., J. Deschenes, et al. (2004). "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse." Mol Endocrinol **18**(6): 1411-27.
- Brown, J. R., E. Nigh, et al. (1998). "Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1." Mol Cell Biol **18**(9): 5609-19.

- Brueggemeier, R. W. (2004). "Aromatase inhibitors: new endocrine treatment of breast cancer." Semin Reprod Med **22**(1): 31-43.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-68.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." Nature **389**(6652): 753-8.
- Bunone, G., P. A. Briand, et al. (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." Embo J **15**(9): 2174-83.
- Burakov, D., C. W. Wong, et al. (2000). "Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex." J Biol Chem **275**(27): 20928-34.
- Burden, S. and Y. Yarden (1997). "Neuregulins and their receptors: a versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis." Neuron **18**(6): 847-55.
- Burgess, A. W., H. S. Cho, et al. (2003). "An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors." Mol Cell **12**(3): 541-52.
- Buzdar, A., J. Douma, et al. (2001). "Phase III, multicenter, double-blind, randomized study of letrozole, an aromatase inhibitor, for advanced breast cancer versus megestrol acetate." J Clin Oncol **19**(14): 3357-66.
- Buzdar, A. U., W. Jonat, et al. (1998). "Anastrozole versus megestrol acetate in the treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma: results of a survival update based on a combined analysis of data from two mature phase III trials. Arimidex Study Group." Cancer **83**(6): 1142-52.
- Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance." J Biol Chem **276**(13): 9817-24.
- Campos, S. M. (2004). "Aromatase inhibitors for breast cancer in postmenopausal women." Oncologist **9**(2): 126-36.
- Chen, D., H. Ma, et al. (1999). "Regulation of transcription by a protein methyltransferase." Science **284**(5423): 2174-7.
- Chen, D., T. Riedl, et al. (2000). "Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7." Mol Cell **6**(1): 127-37.
- Chen, H., R. J. Lin, et al. (1997). "Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300." Cell **90**(3): 569-80.
- Chen, H., R. J. Lin, et al. (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." Cell **98**(5): 675-86.
- Chen, R. H., C. Abate, et al. (1993). "Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 10952-6.
- Chen, R. H., R. Tung, et al. (1993). "Cytoplasmic to nuclear signal transduction by mitogen-activated protein kinase and 90 kDa ribosomal S6 kinase." Biochem Soc Trans **21**(4): 895-900.

- Clark, G. M. and W. L. McGuire (1991). "Follow-up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer." Cancer Res **51**(3): 944-8.
- Clarke, R., M. C. Liu, et al. (2003). "Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling." Oncogene **22**(47): 7316-39.
- Conzen, S. D. (2003). "Current status of selective estrogen receptor modulators (SERMs)." Cancer J **9**(1): 4-14.
- Cutler, R. E., Jr., R. M. Stephens, et al. (1998). "Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9214-9.
- Dana, S. L., P. A. Hoener, et al. (1994). "Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells." Mol Endocrinol **8**(9): 1193-207.
- Darimont, B. D., R. L. Wagner, et al. (1998). "Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions." Genes Dev **12**(21): 3343-56.
- Deblois, G. and V. Giguere (2003). "Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(2-5): 123-31.
- Deng, T. and M. Karin (1994). "c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK." Nature **371**(6493): 171-5.
- Derijard, B., M. Hibi, et al. (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-37.
- Dhillon, A. S. and W. Kolch (2002). "Untying the regulation of the Raf-1 kinase." Arch Biochem Biophys **404**(1): 3-9.
- Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, et al. (1987). "erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells." Science **237**(4811): 178-82.
- Di Marco, E., J. H. Pierce, et al. (1990). "Transformation of NIH 3T3 cells by overexpression of the normal coding sequence of the rat neu gene." Mol Cell Biol **10**(6): 3247-52.
- Dickson, R. B. and M. E. Lippman (1988). "Control of human breast cancer by estrogen, growth factors, and oncogenes." Cancer Treat Res **40**: 119-65.
- Dickson, R. B., M. E. McManaway, et al. (1986). "Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth." Science **232**(4757): 1540-3.
- Ding, X. F., C. M. Anderson, et al. (1998). "Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities." Mol Endocrinol **12**(2): 302-13.
- Dowsett, M. (2001). "Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer." Endocr Relat Cancer **8**(3): 191-5.
- Edwards, D. P. (1999). "Coregulatory proteins in nuclear hormone receptor action." Vitam Horm **55**: 165-218.
- Edwards, D. P. (2000). "The role of coactivators and corepressors in the biology and mechanism of action of steroid hormone receptors." J Mammary Gland Biol Neoplasia **5**(3): 307-24.

- Endoh, H., K. Maruyama, et al. (1999). "Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5363-72.
- Ewen, M. E. (2000). "Relationship between Ras pathways and cell cycle control." *Prog Cell Cycle Res* **4**: 1-17.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." *Genes Dev* **14**(16): 2015-27.
- Ferrero-Pous, M., K. Hacene, et al. (2000). "Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis." *Clin Cancer Res* **6**(12): 4745-54.
- Fisher, B., J. P. Costantino, et al. (1998). "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." *J Natl Cancer Inst* **90**(18): 1371-88.
- Fisher, B., J. Dignam, et al. (1996). "Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors." *J Natl Cancer Inst* **88**(21): 1529-42.
- Font de Mora, J. and M. Brown (2000). "AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor." *Mol Cell Biol* **20**(14): 5041-7.
- Freedman, L. P. (1992). "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region." *Endocr Rev* **13**(2): 129-45.
- Fresno Vara, J. A., E. Casado, et al. (2004). "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." *Cancer Treat Rev* **30**(2): 193-204.
- Fujita, T., Y. Kobayashi, et al. (2003). "Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells." *J Biol Chem* **278**(29): 26704-14.
- Galcheva-Gargova, Z., B. Derijard, et al. (1994). "An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells." *Science* **265**(5173): 806-8.
- Galipeau, J., H. Li, et al. (1999). "Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer." *Cancer Res* **59**(10): 2384-94.
- Gandini, O., H. Kohno, et al. (1997). "Two transcription activation functions in the amino terminus of the mouse estrogen receptor that are affected by the carboxy terminus." *Steroids* **62**(7): 508-15.
- Gangloff, M., M. Ruff, et al. (2001). "Crystal structure of a mutant hERalpha ligand-binding domain reveals key structural features for the mechanism of partial agonism." *J Biol Chem* **276**(18): 15059-65.
- Geisler, J., N. King, et al. (1996). "Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer." *Br J Cancer* **74**(8): 1286-91.
- Glass, C. K. (1994). "Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers." *Endocr Rev* **15**(3): 391-407.
- Gonzalez, F. A., D. L. Raden, et al. (1991). "Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases." *J Biol Chem* **266**(33): 22159-63.

- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, et al. (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." Embo J **16**(7): 1647-55.
- Green, S. and P. Chambon (1987). "Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor." Nature **325**(6099): 75-8.
- Green, S., V. Kumar, et al. (1988). "The N-terminal DNA-binding 'zinc finger' of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity." Embo J **7**(10): 3037-44.
- Guy, P. M., J. V. Platko, et al. (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 8132-6.
- Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 465-503.
- Hanstein, B., S. Djahansouzi, et al. (2004). "Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer." Eur J Endocrinol **150**(3): 243-55.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, et al. (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-6.
- Herbst, R. S. (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology." Int J Radiat Oncol Biol Phys **59**(2 Suppl): 21-6.
- Hewitt, S. C. and K. S. Korach (2003). "Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues." Reproduction **125**(2): 143-9.
- Hill, C. S. and R. Treisman (1995). "Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity." Cell **80**(2): 199-211.
- Hittelman, A. B., D. Burakov, et al. (1999). "Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins." Embo J **18**(19): 5380-8.
- Hubbard, R. E., A. C. Pike, et al. (2000). "Structural insights into the mechanisms of agonism and antagonism in oestrogen receptor isoforms." Eur J Cancer **36** Suppl 4: S17-8.
- Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." Cell **100**(1): 113-27.
- Hynes, N. E., K. Horsch, et al. (2001). "The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators." Endocr Relat Cancer **8**(3): 151-9.
- Iavarone, C., A. Catania, et al. (2003). "The platelet-derived growth factor controls c-myc expression through a JNK- and AP-1-dependent signaling pathway." J Biol Chem **278**(50): 50024-30.
- Ihle, J. N. (1996). "STATs and MAPKs: obligate or opportunistic partners in signaling." Bioessays **18**(2): 95-8.
- Ismail, S. M. (1998). "Endometrial changes during tamoxifen treatment." Lancet **351**(9105): 838.
- Jacquemier, J. D., J. Hassoun, et al. (1990). "Distribution of estrogen and progesterone receptors in healthy tissue adjacent to breast lesions at various stages--immunohistochemical study of 107 cases." Breast Cancer Res Treat **15**(2): 109-17.



- Jakacka, M., M. Ito, et al. (2001). "Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway." J Biol Chem **276**(17): 13615-21.
- Jamil, A., J. D. Croxtall, et al. (1991). "The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells (Ishikawa)." J Mol Endocrinol **6**(3): 215-21.
- Janknecht, R., M. A. Cahill, et al. (1995). "Signal integration at the c-fos promoter." Carcinogenesis **16**(3): 443-50.
- Jiang, H., H. Lu, et al. (1999). "PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner." Mol Cell Biol **19**(12): 8136-45.
- Joel, P. B., J. Smith, et al. (1998). "pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167." Mol Cell Biol **18**(4): 1978-84.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." Science **298**(5600): 1911-2.
- Johnson, R. S., B. M. Spiegelman, et al. (1992). "Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene." Cell **71**(4): 577-86.
- Jordan, V. C. (2004). "Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer." Cancer Cell **5**(3): 207-13.
- Kajimoto, Y. and Y. Umayahara (1998). "AP-1-like motif as a key to understanding the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene regulation." Endocr J **45**(1): 1-12.
- Kastner, P., A. Krust, et al. (1990). "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B." Embo J **9**(5): 1603-14.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-4.
- Khorasanizadeh, S. and F. Rastinejad (2001). "Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements." Trends Biochem Sci **26**(6): 384-90.
- Klinge, C. M. (2000). "Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors." Steroids **65**(5): 227-51.
- Klinge, C. M. (2001). "Estrogen receptor interaction with estrogen response elements." Nucleic Acids Res **29**(14): 2905-19.
- Knowlden, J. M., I. R. Hutcheson, et al. (2003). "Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells." Endocrinology **144**(3): 1032-44.
- Korach, K. S., J. F. Couse, et al. (1996). "Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes." Recent Prog Horm Res **51**: 159-86; discussion 186-8.
- Kouzarides, T. and E. Ziff (1988). "The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction." Nature **336**(6200): 646-51.
- Kraus, W. L. and J. T. Kadonaga (1998). "p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation." Genes Dev **12**(3): 331-42.

- Kraus, W. L., E. M. McInerney, et al. (1995). "Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12314-8.
- Kuiper, G. G., G. J. van den Bermd, et al. (1999). "Estrogen receptor and the SERM concept." J Endocrinol Invest **22**(8): 594-603.
- Kurokawa, H. and C. L. Arteaga (2001). "Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer." Clin Cancer Res **7**(12 Suppl): 4436s-4442s; discussion 4411s-4412s.
- Kurokawa, H. and C. L. Arteaga (2003). "ErbB (HER) receptors can abrogate antiestrogen action in human breast cancer by multiple signaling mechanisms." Clin Cancer Res **9**(1 Pt 2): 511S-5S.
- Kurokawa, H., A. E. Lenferink, et al. (2000). "Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells." Cancer Res **60**(20): 5887-94.
- Kushner, P. J., D. A. Agard, et al. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 311-7.
- Kuukasjarvi, T., J. Kononen, et al. (1996). "Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy." J Clin Oncol **14**(9): 2584-9.
- Lannigan, D. A. (2003). "Estrogen receptor phosphorylation." Steroids **68**(1): 1-9.
- Lanz, R. B., N. J. McKenna, et al. (1999). "A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex." Cell **97**(1): 17-27.
- Lasset, C., V. Bonadona, et al. (1998). "Risk of endometrial cancer in premenopausal women on tamoxifen." Lancet **352**(9138): 1476.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, et al. (1994). "A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis." Nature **372**(6508): 739-46.
- Lee, W., P. Mitchell, et al. (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." Cell **49**(6): 741-52.
- Leone, G., J. DeGregori, et al. (1997). "Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F." Nature **387**(6631): 422-6.
- Lippman, M. E., K. K. Huff, et al. (1986). "Estrogens regulate production of specific growth factors in hormone-dependent human breast cancer." Ann N Y Acad Sci **464**: 11-6.
- Lipton, A., S. M. Ali, et al. (2003). "Serum HER-2/neu and response to the aromatase inhibitor letrozole versus tamoxifen." J Clin Oncol **21**(10): 1967-72.
- Liu, Y., D. el-Ashry, et al. (1995). "MCF-7 breast cancer cells overexpressing transfected c-erbB-2 have an in vitro growth advantage in estrogen-depleted conditions and reduced estrogen-dependence and tamoxifen-sensitivity in vivo." Breast Cancer Res Treat **34**(2): 97-117.
- Liu, Y., J. Ludes-Meyers, et al. (2002). "Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth." Oncogene **21**(50): 7680-9.
- Lonardo, F., E. Di Marco, et al. (1990). "The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand." New Biol **2**(11): 992-1003.

- Lopez, G. N., C. W. Turck, et al. (2001). "Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity." *J Biol Chem* **276**(25): 22177-82.
- Mader, S., P. Chambon, et al. (1993). "Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain." *Nucleic Acids Res* **21**(5): 1125-32.
- Malik, S. and R. G. Roeder (2000). "Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells." *Trends Biochem Sci* **25**(6): 277-83.
- Mallette, F. A., S. Goumard, et al. (2004). "Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence." *Oncogene* **23**(1): 91-9.
- Marais, R., J. Wynne, et al. (1993). "The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain." *Cell* **73**(2): 381-93.
- Marmor, M. D., K. B. Skaria, et al. (2004). "Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**(3): 903-13.
- Martini, P. G. and B. S. Katzenellenbogen (2001). "Regulation of prothymosin alpha gene expression by estrogen in estrogen receptor-containing breast cancer cells via upstream half-palindromic estrogen response element motifs." *Endocrinology* **142**(8): 3493-501.
- Merchant, J. L., M. Du, et al. (1999). "Sp1 phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding." *Biochem Biophys Res Commun* **254**(2): 454-61.
- Metivier, R., G. Penot, et al. (2001). "Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains." *Mol Endocrinol* **15**(11): 1953-70.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, et al. (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." *Embo J* **15**(6): 1292-300.
- Migliaccio, A., D. Piccolo, et al. (1998). "Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor." *Embo J* **17**(7): 2008-18.
- Moggs, J. G. and G. Orphanides (2001). "Estrogen receptors: orchestrators of pleiotropic cellular responses." *EMBO Rep* **2**(9): 775-81.
- Morley, P., J. F. Whitfield, et al. (1992). "A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium." *Endocrinology* **131**(3): 1305-12.
- Nagy, L. and J. W. Schwabe (2004). "Mechanism of the nuclear receptor molecular switch." *Trends Biochem Sci* **29**(6): 317-24.
- Nilsson, S., S. Makela, et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." *Physiol Rev* **81**(4): 1535-65.
- Ogiso, H., R. Ishitani, et al. (2002). "Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains." *Cell* **110**(6): 775-87.
- Osborne, C. K. (1998). "Tamoxifen in the treatment of breast cancer." *N Engl J Med* **339**(22): 1609-18.
- Parker, M. G. (1993). "Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action." *Breast Cancer Res Treat* **26**(2): 131-7.

- Pedram, A., M. Razandi, et al. (1998). "Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* **273**(41): 26722-8.
- Peekhaus, N. T., T. Chang, et al. (2004). "Distinct effects of the antiestrogen Faslodex on the stability of estrogen receptors-alpha and -beta in the breast cancer cell line MCF-7." *J Mol Endocrinol* **32**(3): 987-95.
- Petz, L. N., Y. S. Ziegler, et al. (2004). "Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site." *Mol Endocrinol* **18**(3): 521-32.
- Philips, A., D. Chalbos, et al. (1993). "Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and c-jun synthesis." *J Biol Chem* **268**(19): 14103-8.
- Picard, D., S. J. Salser, et al. (1988). "A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor." *Cell* **54**(7): 1073-80.
- Pietras, R. J., J. Arboleda, et al. (1995). "HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells." *Oncogene* **10**(12): 2435-46.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (2000). "A structural biologist's view of the oestrogen receptor." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 261-8.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (2000). "Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." *Biochem Soc Trans* **28**(4): 396-400.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (2001). "Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen." *Structure (Camb)* **9**(2): 145-53.
- Porter, W., B. Saville, et al. (1997). "Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor." *Mol Endocrinol* **11**(11): 1569-80.
- Press, M. F., L. Bernstein, et al. (1997). "HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas." *J Clin Oncol* **15**(8): 2894-904.
- Prevot, V., D. Croix, et al. (1999). "Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via a membrane receptor." *Endocrinology* **140**(2): 652-9.
- Rachez, C., M. Gamble, et al. (2000). "The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes." *Mol Cell Biol* **20**(8): 2718-26.
- Rachez, C., Z. Suldan, et al. (1998). "A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system." *Genes Dev* **12**(12): 1787-800.
- Raychowdhury, R., G. Schafer, et al. (2002). "Interaction of early growth response protein 1 (Egr-1), specificity protein 1 (Sp1), and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate response element binding protein (CREB) at a proximal response element is critical for gastrin-dependent activation of the chromogranin A promoter." *Mol Endocrinol* **16**(12): 2802-18.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (2000). "Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer." *Mol Endocrinol* **14**(9): 1434-47.

- Reis, S. E., J. P. Costantino, et al. (2001). "Cardiovascular effects of tamoxifen in women with and without heart disease: breast cancer prevention trial. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Breast Cancer Prevention Trial Investigators." *J Natl Cancer Inst* **93**(1): 16-21.
- Riabowol, K. T., R. J. Vosatka, et al. (1988). "Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells." *Mol Cell Biol* **8**(4): 1670-6.
- Rochette-Egly, C., S. Adam, et al. (1997). "Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7." *Cell* **90**(1): 97-107.
- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, et al. (1999). "Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex." *J Biol Chem* **274**(32): 22296-302.
- Ross, J. S. and J. A. Fletcher (1998). "The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy." *Stem Cells* **16**(6): 413-28.
- Rowan, B. G., N. L. Weigel, et al. (2000). "Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* **275**(6): 4475-83.
- Sanchez, R., D. Nguyen, et al. (2002). "Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors." *Bioessays* **24**(3): 244-54.
- Santen, R. J., R. X. Song, et al. (2002). "The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **80**(2): 239-56.
- Saville, B., M. Wormke, et al. (2000). "Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements." *J Biol Chem* **275**(8): 5379-87.
- Schiff, R., S. Massarweh, et al. (2003). "Breast cancer endocrine resistance: how growth factor signaling and estrogen receptor coregulators modulate response." *Clin Cancer Res* **9**(1 Pt 2): 447S-54S.
- Schiff, R., P. Reddy, et al. (2000). "Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo." *J Natl Cancer Inst* **92**(23): 1926-34.
- Schiltz, R. L., C. A. Mizzen, et al. (1999). "Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates." *J Biol Chem* **274**(3): 1189-92.
- Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* **103**(2): 211-25.
- Schwabe, J. W., L. Chapman, et al. (1993). "The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements." *Cell* **75**(3): 567-78.
- Segatto, O., F. Lonardo, et al. (1990). "The role of autophosphorylation in modulation of erbB-2 transforming function." *New Biol* **2**(2): 187-95.
- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.
- Shang, Y. and M. Brown (2002). "Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs." *Science* **295**(5564): 2465-8.

- Sharma, D. and J. D. Fondell (2002). "Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7934-9.
- Shiau, A. K., D. Barstad, et al. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-37.
- Shou, J., S. Massarweh, et al. (2004). "Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer." J Natl Cancer Inst **96**(12): 926-35.
- Simoncini, T., L. Fornari, et al. (2002). "Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase." Steroids **67**(12): 935-9.
- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, et al. (2000). "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase." Nature **407**(6803): 538-41.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." Science **244**(4905): 707-12.
- Sliwkowski, M. X., J. A. Lofgren, et al. (1999). "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." Semin Oncol **26**(4 Suppl 12): 60-70.
- Sluss, H. K., T. Barrett, et al. (1994). "Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases." Mol Cell Biol **14**(12): 8376-84.
- Smale, S. T., M. C. Schmidt, et al. (1990). "Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4509-13.
- Smith, C. L., Z. Nawaz, et al. (1997). "Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen." Mol Endocrinol **11**(6): 657-66.
- Sommer, A., J. Hoffmann, et al. (2003). "Studies on the development of resistance to the pure antiestrogen Faslodex in three human breast cancer cell lines." J Steroid Biochem Mol Biol **85**(1): 33-47.
- Song, R. X., R. A. McPherson, et al. (2002). "Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation." Mol Endocrinol **16**(1): 116-27.
- Spencer, T. E., G. Jenster, et al. (1997). "Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase." Nature **389**(6647): 194-8.
- Stern, D. F. (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases." Breast Cancer Res **2**(3): 176-83.
- Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 435-59.
- Sugita, S., H. Kawashima, et al. (2004). "Effect of type I growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors on phosphorylation and transactivation activity of the androgen receptor in prostate cancer cells: Ligand-independent activation of the N-terminal domain of the androgen receptor." Oncol Rep **11**(6): 1273-9.
- Suske, G. (1999). "The Sp-family of transcription factors." Gene **238**(2): 291-300.

- Tamemoto, H., T. Kadowaki, et al. (1992). "Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells." J Biol Chem **267**(28): 20293-7.
- Tanenbaum, D. M., Y. Wang, et al. (1998). "Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5998-6003.
- Testa, J. R. and A. Bellacosa (2001). "AKT plays a central role in tumorigenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 10983-5.
- Teyssier, C., K. Belguise, et al. (2001). "Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins." J Biol Chem **276**(39): 36361-9.
- Torchia, J., D. W. Rose, et al. (1997). "The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function." Nature **387**(6634): 677-84.
- Tournier, C., P. Hess, et al. (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-4.
- Umayahara, Y., R. Kawamori, et al. (1994). "Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer." J Biol Chem **269**(23): 16433-42.
- Van Den Bemd, G. J., G. G. Kuiper, et al. (1999). "Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability." Biochem Biophys Res Commun **261**(1): 1-5.
- Viglietto, G., M. L. Motti, et al. (2002). "Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer." Nat Med **8**(10): 1136-44.
- Voegel, J. J., M. J. Heine, et al. (1998). "The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways." Embo J **17**(2): 507-19.
- Watanabe, M., J. Yanagisawa, et al. (2001). "A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA." Embo J **20**(6): 1341-52.
- Watanabe, T., S. Inoue, et al. (1997). "Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta." Biochem Biophys Res Commun **236**(1): 140-5.
- Webb, P., G. N. Lopez, et al. (1995). "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." Mol Endocrinol **9**(4): 443-56.
- Webb, P., P. Nguyen, et al. (1999). "The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions." Mol Endocrinol **13**(10): 1672-85.
- Westin, S., R. Kurokawa, et al. (1998). "Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators." Nature **395**(6698): 199-202.

- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**(10): 589-607.
- Witters, L., L. Engle, et al. (2002). "Restoration of estrogen responsiveness by blocking the HER-2/neu pathway." Oncol Rep **9**(6): 1163-6.
- Wong, C. W., C. McNally, et al. (2002). "Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14783-8.
- Wurtz, J. M., W. Bourguet, et al. (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." Nat Struct Biol **3**(1): 87-94.
- Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.
- Zhang, Z., R. Kumar, et al. (2004). "The role of adapter protein Shc in estrogen nongenomic action." Steroids **69**(8-9): 523-9.
- Zilliagus, J., A. P. Wright, et al. (1995). "Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors." Mol Endocrinol **9**(4): 389-400.



**ANNEXE 1 : FIGURES SUPPLÉMENTAIRES**

**Figure 20: Influence positive de la surexpression du cDNA de ErbB2 sur la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle de 3 ERE**

Des cellules épithéliales de rein humain de lignée HEK293 ER négatives ont été transfectées par phosphate de calcium dans des plaques à 6 puits de manière transitoire (méthode de précipitation de l'ADN par phosphate de calcium) avec le vecteur pEV7-ErbB2 contenant le cDNA de ErbB2 ou avec le vecteur vide pEV7 (contrôle). Ces vecteurs ont été co-transfectés avec pSG5-HEG0 et le plasmide rapporteur ERE3-TATA-LUC. Un vecteur contrôle de transfection CMV-bGal a aussi été co-transfecté. Les cellules ont été mises en présence de  $2,5 \times 10^{-8}$  M estradiol (E2),  $10^{-6}$  M tamoxifène (Tam), ou  $10^{-7}$  M ICI182,780 (ICI) solution dans de l'éthanol *immédiatement* après la transfection. Les données brutes des essais enzymatiques luciférase ont été normalisées par bGal. Les expériences sont réalisées en triplicata et reproduites 2 fois (résultat représentatif des 2 expériences).

**Figure 20****A. ERE3-TATA-LUC+ ER $\alpha$** 