

Université de Montréal

**Transcription par les récepteurs des estrogènes
Identification d'un gène cible et d'un nouveau corépresseur**

Par Lydia Edjekouane

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
En Biochimie

31 Décembre 2016

© Lydia Edjekouane, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Transcription par les récepteurs des estrogènes
Identification d'un gène cible et d'un nouveau corépresseur**

Présentée par :
Lydia Edjekouane

Évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Moreau, président-rapporteur
André Tremblay, directeur de recherche
Stéphane Roy, membre du jury
Éric Asselin, examinateur externe
Pierrette Gaudreau, représentante du doyen de la FES

Résumé

Malgré de nombreux progrès réalisés dans les traitements des cancers gynécologiques, ceux-ci demeurent la principale cause de mortalité due au cancer chez la femme. Les instabilités chromosomiques et génomiques au niveau du locus 3p21.3 sont des événements fréquents liés à des cancers épithéliaux, notamment les cancers du sein et de l'ovaire. C'est dans cette région que se trouvent les gènes hyaluronidases HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3. HYAL-1 est particulièrement surexprimé dans plusieurs cancers, notamment, le cancer de la prostate, la vessie, le cou, la tête et le sein où il est impliqué dans la progression tumorale et les métastases. Nous avons démontré que dans le locus 3p21.3, HYAL-1 est un gène cible sélectivement réprimé par ER α et l'estrogène. L'analyse de la cohorte METABRIC a révélé une corrélation inverse significative entre l'expression du gène HYAL-1 et ER α . Nous avons identifié des sites de liaison pour ER α au niveau du locus 3p21.3, parmi eux, un ERE proximal était responsable de la répression de HYAL-1 par ER α en plus d'un site Sp-1 requis pour atteindre une répression optimale. Cette répression de HYAL-1 est accompagnée par un enrichissement de la marque répressive H3K27me3 au niveau des deux sites ERE et Sp-1.

En plus de réguler l'expression de nombreux gènes, l'activité transcriptionnelle des ERs est aussi régulée par les corégulateurs qui sont recrutés sur les ERs. Nous avons identifié un nouveau partenaire d'interaction inattendu pour les ERs, soit le facteur de transcription hématopoïétique TAL1. Malgré sa réputation d'oncogène dans les leucémies lymphoblastiques aiguës des cellules T, ce facteur de transcription est un corépresseur d'ER α , dû à son effet répresseur direct sur l'activité transcriptionnelle du récepteur en réponse à l'estrogène et donc sur l'expression de ces gènes cible dans le cancer du sein. De plus, TAL1 réprime aussi

l'activation d'ER α en réponse à la phosphorylation induite par la voie des MAPK/Erk. Cette répression d'ER α par TAL1 résulte en une diminution de la prolifération et la migration des cellules cancéreuses mammaires.

Mots-clés : récepteurs des estrogènes, ER, estrogène, hyaluronidase-1, HYAL-1, gène cible, répression, locus 3p21.3, TAL1, corépresseur, régulation transcriptionnelle, cancer du sein.

Abstract

Despite many advances in treatment of gynecological cancers, they remain the leading cause of cancer death in women. Chromosomal and genome instabilities at the 3p21.3 locus are frequent events related to epithelial cancers, including breast and ovarian cancers. It is in this region that the hyaluronidase HYAL-1, HYAL-2 and HYAL-3 genes are found. HYAL-1 is particularly overexpressed in several cancers, including prostate, bladder, neck, head and breast cancers where it promotes tumor progression and metastasis. We demonstrate here, that in the 3p21.3 locus, HYAL-1 is a target gene selectively repressed by ER α and estrogen. Integrative data mining using METABRIC dataset revealed a significant inverse correlation between ER α and HYAL-1 gene expression in human breast tumors. We identified binding sites for ER α at the 3p21.3 locus, among which a proximal ERE responsible for repression of HYAL-1 by ER α , in addition to an Sp-1 site required to achieve optimal repression. This repression of HYAL-1 is accompanied by an enrichment of the repressive mark H3K27me3 at the two sites ERE and Sp-1.

In addition to regulate the expression of many target genes, the transcriptional activity of estrogen receptors is also regulated by coregulators who are recruited on ERs. We identified a new unexpected interaction partner for ERs, the hematopoietic transcription factor TAL1. Despite its reputation as an oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia, this transcription factor is an ER α -corepressor due to its direct repressive effect on the transcriptional activity of the receptor in response to estrogen and thus to expression of its target genes in breast cancer. Moreover, TAL1 also inhibits ERs activation in response to phosphorylation induced by the

MAPK/Erk pathway. This repression of ER α by TAL1 results in decreased growth and migration of mammary cancer cells.

Keywords: Estrogen receptors, ER, estrogen, hyaluronidase-1, HYAL-1, target gene, repression, 3p21.3 locus, TAL1, corepressor, transcriptional regulation, breast cancer.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 Introduction	1
1. Le cancer du sein	1
1.1. Facteurs de risque du cancer du sein.....	1
2 Les estrogènes : synthèse, physiologie et physiopathologie	3
2.1 Importance des estrogènes	5
3 Les récepteurs des estrogènes : médiateurs de la signalisation cellulaire.....	8
3.1 Découverte des ERs	8
3.2 Les gènes codants les ERs	9
3.3 Organisation structurale des ERs.....	11
3.4 Mécanismes d'action des ERs : dualité de fonction, récepteurs et facteurs de transcriptions.....	13
3.4.1 Mécanisme d'action classique	13
3.4.2 Mécanismes d'action non classiques	20
3.4.3 Les corégulateurs transcriptionnels.....	23
3.4.4 Régulation de la l'activité des ERs par les modifications post-traductionnelles ..	29
3.5 Rôles biologiques des ERs.....	37
3.5.1 Distribution tissulaire.....	37
3.5.2 Études de souris « knock-out » : Rôle des ERs dans l'appareil reproducteur ..	37
3.6 Les ERs et le cancer	38
3.6.1 Rôles d'ER α	39
3.6.2 Rôle d'ER β	40
3.7 Approches thérapeutiques pour antagoniser les ERs	42

3.7.1	L'hormonothérapie	42
3.7.2	Anticorps monoclonaux.....	49
3.7.3	Inhibiteurs de l'aromatase.....	49
3.7.4	Composés interférant avec la liaison des ERs à l'ADN ou aux cofacteurs	50
4	Les hyaluronidases.....	51
4.1	Classification.....	51
4.2	Organisation génomique	52
4.3	Structures, distribution et rôles physiologiques des hyaluronidases mammifères....	55
4.4	Les hyaluronidases et le cancer.....	59
4.5	L'acide hyaluronique	60
5	Le facteur de transcription TAL1	64
5.1	Découverte du gène <i>Scl/Tal1</i>	64
5.2	Expression de TAL1	65
5.3	Structure de TAL1	66
5.4	Rôle physiologique de TAL1 durant l'hématopoïèse	68
5.5	Mécanisme d'action de TAL1 dans les leucémies T-ALL	69
5.6	Régulation transcriptionnelle par TAL1	71
6	Hypothèses et objectifs	74
	Chapitre 2 Résultats	76
	1 ^{ère} publication	76
	2 ^{ième} publication	129
	Chapitre 3 Discussion générale, perspective et conclusion	169
	Discussion	169
1.1	Identification d'un gène cible du récepteur de l'estrogène ER α	169
1.1.1	Régulation de l'expression du gène de la hyaluronidase HYAL-1 par ER α et les estrogènes.....	169
1.1.2	HYAL-1, un gène cible réprimé de façon sélective par ER α et les estrogènes ..	171
1.1.3	Recrutement d'ER α sur le promoteur de HYAL-1	172
1.1.4	Mécanisme de la répression de HYAL-1 par ER α	173

1.1.5 Rôles respectifs des sites ERE -900 et Sp-1 -1020 dans la répression de HYAL-1 par ER α	176
1.2 Identification d'un nouveau corépresseur des ERs, TAL1 : de facteur hématopoïétique à répresseur de l'activité des ERs	177
1.2.1 Interaction entre TAL1 et les ERs	178
1.2.2 Impact de TAL1 sur l'activité transcriptionnelle des ERs.....	179
1.2.3 Mécanisme d'action de TAL1	180
1.2.4 Rôle de TAL1 dans le cancer du sein	183
Perspectives.....	185
Conclusion	188
Bibliographie.....	190

Liste des figures

Figure 1.	Biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol.....	4
Figure 2.	Effets positifs et négatifs des estrogènes sur leurs tissus cibles chez la femme	7
Figure 3.	Représentation des différents isoformes d'ER α et ER β	10
Figure 4.	Domaines fonctionnels des récepteurs des estrogènes.....	11
Figure 5.	Structure du LBD d'ER α déterminée aux rayons X.	13
Figure 6.	Les différents types d'éléments de réponse à l'estrogène reconnus par les ERs....	17
Figure 7.	Représentation schématique de la séquence du domaine de liaison à l'ADN des ERs.....	18
Figure 8.	Résumé des différents mécanismes d'action des ERs..	23
Figure 9.	Représentation des différents coactivateurs et corépresseurs impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs.	29
Figure 10.	Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER α	33
Figure 11.	Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER β	35
Figure 12.	Processus cellulaires impliqués dans la tumorigenèse.....	40
Figure 13.	Structure chimique du 17 β -estradiol et de quatre anti-estrogènes.....	48
Figure 14.	Arrangement chromosomique des différents gènes hyaluronidases chez l'humain et la souris	53
Figure 15.	Les gènes codant les hyaluronidases humaines.	54
Figure 16.	Les différents domaines protéiques des hyaluronidases.	55
Figure 17.	Représentation de la structure du HA	61
Figure 18.	Mécanisme d'action de HYAL-1/HA dans la tumorigenèse.	63
Figure 19.	Schéma représentant les deux isoformes de la protéine TAL1	68

Liste des abréviations

aa	Acide aminé
AD1	Activation domaine 1
AD2	Activation domaine 2
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AP1	Activating protein 1
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine triphosphate
bHLH	basic helix loop helix
BMP-7	Bone morphogenetic protein-7
BRCA1	Breast cancer 1
CARM	Co-activator Associated arginine Methyl Transferase
CBP	CREB-binding protein
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CÉO	Cancer Épithelial de l'Ovaire
ChIP	chromatine immunoprecipitation
CREB	cAMP response element-binding protein
Ct	cycle threshold
CTNNB1	gène encodant les β -catenins.
DBD	DNA Binding Domaine
DPN	diarylpropionitrile E
E1	Estrone
E2	Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrole
E6-AP	Potéine associée à E6
EGF	Epidermal growth factor

Egr-1	Early growth response-1
ER	Récepteur de l'estrogène
ERE	Estrogen Response Element
ERR	Estrogen related receptor
EZH2	Enhancer of Zeste homolog 2
FBS	Fetal bovin serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSH	Hormone folliculostimulante
GATA	GATA binding protein
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GPI	Glycosylphosphatidil-inositol
GR	Récepteur des glucocorticoïde
GREB1	Growth Regulation by estrogen in Breast cancer
GSK-3	Kinase Glycogène synthase 3
HA	Acide Hyaluronique
HDAC	Histone desacétylase
HDL	Lipoprotéines de haute densité
Hsp90	Heat shock protein 90
HYAL-1	Hyaluronidase 1
HYAL-2	Hyaluronidase 2
HYAL-3	Hyaluronidase 3
ICI	Imperial chemical industries
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunoglobuline de type g
Kb	Kilo bases
KDa	Kilo Dalton
KO	Knock out
LBD	Ligand binding domaine
LCOR	ligand-dependent corepressor
LDB1	LIM domain binding protein 1
LH	Hormone lutéinisante
LMO2	LIM domain only 2

LSD1	Lysine Specific Demethylase 1
LXR	Liver X receptor
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Michigan cancer foundation-7
Mdm2	Murine double minute 2
MPT	Modification post-traductionnelle
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
NCoR	Nuclear Hormone Corepressor
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NRIP1	Nuclear receptor interacting factor 1
OHT	Hydroxy-tamoxifène
OMS	Organisation mondiale de la santé
PADI4	Peptidylarginine deiminase IV
Pb	Paire de base
p/CAF	p300/CBP-associated factor
PI3k	Phosphoinositide 3 -kinase
PKA	Protéine kinase A
PPAR	Récepteur activé par les proliférateurs des peroxysomes
PPT	Propylpyrazoletriol
PR	Récepteur de la progestérone
PRMT	Protein Argenin Methyl Transferase
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
REA	Repressor of Estrogen Receptor Activity
RHAMM	Receptor for hyaluronan-mediated motility
RIP140	Receptor-Interacting Protein 140
ROS	Reactive oxygen species
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
RVD	Récepteur de la vitamine D
RXR	Récepteur X des rétinoïdes
SCL	Stem Cell Leukemia
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SERD	Selective estrogen receptor down-regulator

SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
Shc	Src homology 2 domain-containing
shRNA	small hairpin RNA
sil	<i>scl</i> interrupting locus
siRNA	small interfering RNA
SMRT	Silencing mediator of retinoic and thyroid hormone Receptors
Sp1	Specificity protein 1
SPAM1	Sperm adhesion molecule 1
SRA	Steroid receptor RNA activator
SRC	Steroid Receptor Coactivator
Src	Tyrosine kinase
Swi/Snf	Switching mating type/sucrose non-fermenting
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
TCL5	T-cell leukemia 5
TFF1	tréfoil factor 1
TGF β	Transforming growth factor beta
TRIB2	Tribbles homolog 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
ZPB	Zona pellucid binding

*Je dédie ce modeste ouvrage à mes parents à
qui je dois tout*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur, le Dr. André Tremblay de m'avoir accueillie dans son laboratoire et donné l'opportunité d'y faire mon doctorat. Je le remercie pour son encadrement et pour la patience qu'il a su faire preuve à mon égard et sa disponibilité durant tout ce temps. Merci de m'avoir donné une grande latitude et une flexibilité dans le choix et le déroulement de mes expériences et aussi la chance d'assister à plusieurs congrès.

Je remercie également le Dre. Euridice Carmona, ma directrice à la maîtrise de m'avoir donné la chance de faire mon stage et ensuite ma maîtrise dans son laboratoire et de m'avoir initiée à la recherche. Merci de m'avoir ouvert les yeux sur la science et la recherche et donné la volonté d'élargir mes connaissances.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, les Drs. Stéphane Roy et Éric Milot pour leur contribution au bon déroulement de mon travail. Ce dernier a gagné en perfectionnement et précision grâce à leurs commentaires, critiques, suggestions et conseils.

Un grand merci aux membres du jury les Drs. Alain Moreau, Stéphane Roy et Éric Asselin pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour tout le temps qu'ils y ont consacré. Ma thèse s'est beaucoup enrichie au contact de leurs commentaires.

Je remercie bien sûr les membres du laboratoire passés et présents, Karine, Véronique, Valérie, Stéphanie et Jonathan pour leur aide. Un grand merci à Samira, ma voisine de bench pour son amitié et de m'avoir aidée, conseillée à chaque fois que j'en avais besoin. Pour tous les bons moments et les moins bons aussi, sans toi ça n'aurait certainement pas été pareil ! Je garderai un bon souvenir de nos fameuses « cellules de crises ».

Finalement, et non les moindres, je tiens à rendre un ultime hommage à ma famille. La thèse représente un grand défi et un parcours professionnel difficile, j'ai eu la chance de passer au travers avec l'appui de parents extraordinaires. Il est certain qu'une grande part de ma réussite est attribuable à mes chers parents. Je les remercie de m'avoir toujours soutenue, encouragée et crue en moi tout au long de mes études. Pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis afin de nous assurer à moi et à mes frères, un avenir meilleur. Si je me suis rendue aussi loin, c'est incontestablement grâce à vous. À travers ce travail, j'espère vous rendre fière. Merci aussi à mes frères pour leur soutien et leurs encouragements.

Chapitre 1 Introduction

1. Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué, et la deuxième principale cause de mortalité par cancer chez la femme au Canada. C'est un grave problème de santé publique puisqu'il représente 25 % de tous les cancers diagnostiqués et provoque 13 % de décès chaque année. En 2017, les estimations indiquent que 26300 nouveaux cas devraient être diagnostiqués, tant dis que 5 400 décès sont attendus. Une femme sur huit sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie et parmi elles, une sur 31 en mourra (Canadian Cancer Society : Canadian Cancer Statistics 2017). Même si la chirurgie et les traitements adjuvants qui l'accompagnent permettent de soigner les patientes, la bataille n'est pas encore gagnée, les traitements étant lourds de conséquences à court et à long terme. Il s'agit d'une affection maligne multifactorielle dont les mécanismes sont, dans l'ensemble, encore mal compris. Les hormones stéroïdiennes, notamment les estrogènes et leurs récepteurs, jouent un rôle fondamental dans la genèse et la progression du cancer du sein.

1.1. Facteurs de risque du cancer du sein

Il y a d'abord les facteurs génétiques tels que les antécédents familiaux et la survenue d'un premier cancer du sein, ils influencent relativement le risque de développer ce type de cancer. En effet, chez une femme ayant un proche au 1er degré atteint d'un cancer du sein, le risque de développer la maladie est multiplié par un facteur de 1,2 à 3 (1). Il existe également une forme de cancer du sein dite héréditaire, elle résulte de la mutation des gènes suppresseurs

de tumeurs, BRCA 1 et 2 (Breast Cancer 1/2) dans 80 à 90 % des cas. La mutation de ces deux gènes représente 5-10 % des cancers du sein diagnostiqués chez la femme avant l'âge de 40 ans (2).

Le mode de vie et les facteurs démographiques semblent aussi influencer le risque relatif de développer un cancer du sein. Ainsi, les femmes nées en Amérique du Nord ou en Europe du Nord et qui vivent en milieu urbain ou appartiennent à une classe socio-économique élevée auraient un risque accru de développer un cancer du sein (3, 4). Ceci est démontré par l'augmentation du risque de développer un cancer du sein chez les femmes émigrant d'Asie où le risque de cancer du sein est normalement faible vers l'Amérique du Nord qui présente un risque élevé de cancer du sein, et ce 10 an après leur établissement (5). Ceci serait dû en partie aux modifications des habitudes alimentaires, qui elles-mêmes constituent un facteur de risque, par exemple, la consommation de viandes et d'alcool (6, 7).

Enfin, les facteurs hormonaux influencent grandement le risque qu'une femme soit atteinte d'un cancer du sein. Ainsi, une première grossesse tardive après 35 ans ou l'absence de grossesse (8), des menstruations précoces ou une ménopause tardive (9), l'hormonothérapie substitutive ou encore les contraceptifs oraux (10), constituent tous des facteurs de risque. En fait, c'est le temps d'exposition aux estrogènes endogènes ou exogènes qui est associé au risque de développer un cancer du sein (11, 12). De la même façon, l'obésité est aussi considérée comme étant un facteur de risque en lien avec l'estrogène produit par les aromatases dans le tissu adipeux mammaire après la ménopause. Ceci s'explique par les propriétés mitotiques des estrogènes sur les cellules épithéliales mammaires, qui en raison de leur fort pouvoir prolifératif deviennent plus sensibles à la transformation par les carcinogènes (13).

2 Les estrogènes : synthèse, physiologie et physiopathologie

Le mot « estrogène » dérive de la racine « œstrus » et gène, qui signifient : « qui provoque l’œstrus ou le cycle menstruel chez les femelles des mammifères ». Ce sont des hormones stéroïdiennes lipophiles dérivées du cholestérol. Il existe quatre estrogènes naturels, l’estrone (E1), le 17 β -estradiol (E2), l’estriole (E3) et l’estetrole (E4). La biosynthèse de E1 et E2 a lieu principalement dans les ovaires au niveau des follicules et du corps jaune ainsi que dans le placenta chez les femmes. Les deux autres hormones E3 et E4 sont synthétisées dans des conditions physiologiques particulières. Ainsi l’estriole n’est synthétisé qu’au cours de la grossesse, tandis que l’estetrole est produit par les cellules du foie du fœtus. Il est à noter aussi que E2 est l’estrogène le plus abondant et ayant une forte affinité avec les récepteurs hormonaux en plus d’avoir un pouvoir estrogénique 10 à 80 fois plus élevé. L’estrone, l’estriole et l’estetrole sont donc considérés comme étant secondaires par rapport à l’estradiol (14, 15). Tout au long de cette thèse, le terme « estrogène » désignera le 17 β -estradiol ou (E2), qui est l’hormone impliquée dans le développement de la glande mammaire et de la plupart des cancers du sein.

Avant la ménopause, la majeure partie des estrogènes est produite dans les ovaires. Leur production est contrôlée par diverses enzymes, les cytochromes P450, les aromatases ainsi que par les hormones hypophysaires LH (hormone lutéinisante) et FSH (hormone folliculo-stimulante) au niveau de l’axe hypothalamo-hypophysaire. La LH initie la synthèse des estrogènes à partir du cholestérol lors de la phase lutéale du cycle ovarien, en stimulant l’expression des enzymes responsables de la conversion du cholestérol en progestérone et en androstenedione. Tandis que la FSH agit sur les cellules folliculaires granulaires en y

augmentant l'aromatisation des androgènes en estrogènes (15-17) (Figure 1). Après la ménopause, il y a arrêt de la production d'estrogènes par les ovaires, qui sont alors produits par les cellules mésenchymateuses des tissus gras, les cellules mammaires, les ostéoblastes et les cellules endothéliales (18, 19). Chez les hommes, une faible production d'estrogènes est assurée grâce à l'aromatisation périphérique des androgènes surrénaux et testiculaires (20).

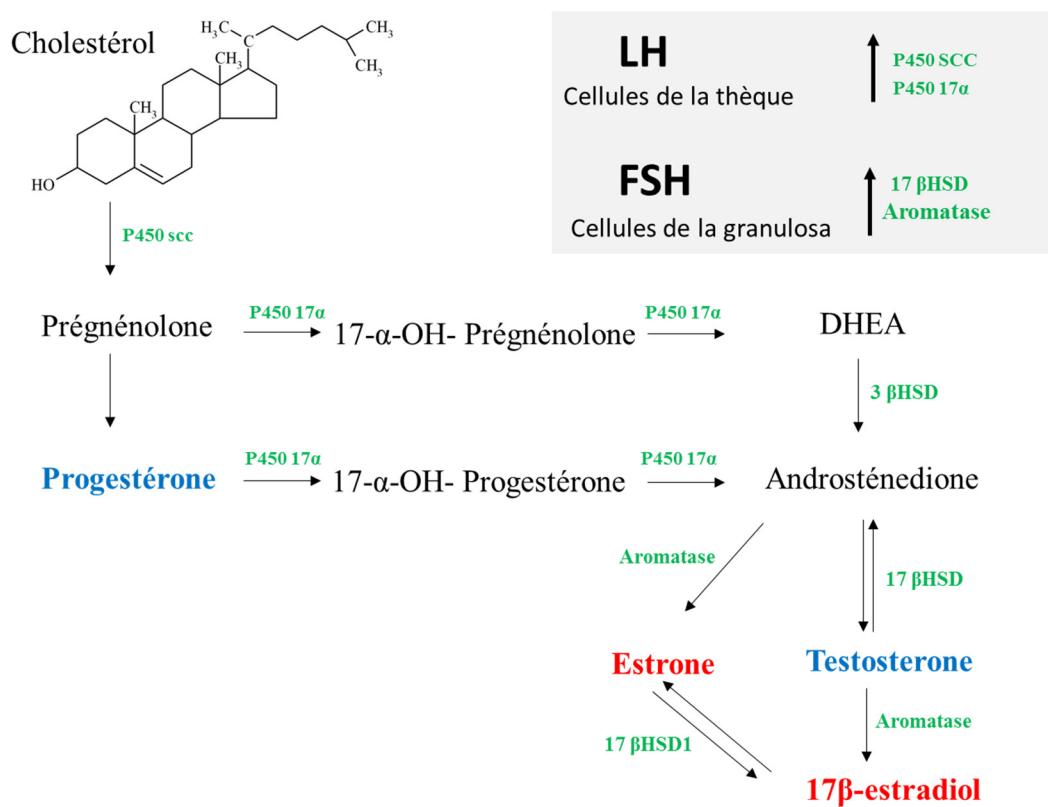


Figure 1. Biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. Adaptée de la référence (15).

2.1 Importance des estrogènes

Suite à leur synthèse, les estrogènes vont rejoindre leurs organes cibles pour y exercer leurs effets. Les estrogènes sont des régulateurs importants de la croissance, de la différenciation et des fonctions biologiques d'un large éventail de tissus, notamment l'appareil reproducteur mâle et femelle, la glande mammaire, le système cardio-vasculaire et nerveux et le tissu osseux (Figure 2).

Les estrogènes ne semblent pas influencer le développement fœtal des glandes mammaires puisqu'elles restent dans un état relativement indifférencié. Ce n'est qu'à la puberté où la production cyclique d'estrogènes et de progestérones par les ovaires stimule la croissance et la différenciation de l'épithélium canalaire, la formation des bourgeons terminaux des conduits mammaires, induit l'activité mitotique des cellules cylindriques canalaire, la prolifération de l'épithélium et la formation des lobes alvéolaires durant la grossesse (21, 22).

Les estrogènes ont aussi un rôle neuro-protecteur en lien avec le remodelage synaptique et dendritique (23), et l'activation gliale dans les tissus cérébraux chez le rat (24). Dans les neurones de l'hippocampe, une région impliquée dans la mémoire, les estrogènes augmentent la densité des récepteurs N-méthyl-D-aspartate (25). Les estrogènes auraient également des fonctions neuro-protectrices face à des pathologies telles que l'Alzheimer en réduisant la production de plaques β -amyloïdes qui s'accumulent dans les cerveaux des patients, et protègent aussi contre la maladie de Parkinson (26, 27).

Les estrogènes sont particulièrement importants pour la croissance et le maintien du tissu osseux (ostéoblastes et ostéoclastes) (28). Ceci a notamment été mis en évidence par le développement de l'ostéoporose chez la femme à la ménopause ou suite à une ovariectomie

(29). L'homéostasie osseuse repose sur la synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes, tant que les ostéoclastes la résorbent. L'ostéoporose se développe en raison de l'augmentation de la résorption de l'os. Concrètement, les estrogènes induisent l'apoptose des ostéoclastes tant que qu'ils ont un effet anti-apoptotique sur les ostéoblastes (30, 31).

Le fait que l'incidence des maladies cardio-vasculaires chez la femme soit inférieure à celle des hommes et qu'elle soit la même après la ménopause suggère que l'estrogène exerce aussi un effet protecteur sur le cœur (32). Ceci a été validé par des modèles animaux, chez la souris notamment, où l'on a montré que l'estrogène prévient l'apparition de l'athérosclérose. En premier, les estrogènes exercent un effet vasodilatateur sur les cellules musculaires lisses et l'épithélium des vaisseaux sanguins et ce en augmentant l'expression de vasodilatateurs comme l'oxyde nitrique ou en diminuant l'expression de vasoconstricteurs tel que l'endothéline-1 (33). Un autre mécanisme important par lequel les estrogènes protègent contre l'athérosclérose est le contrôle de l'hypercholestérolémie, en augmentant la concentration des lipoprotéines de haute densité (HDL). On sait par exemple que la prise orale d'estrogène chez la femme ménopausée augmente de 10 à 15 fois les niveaux de HDLs (34). Les HDLs jouent un rôle essentiel dans le processus du transport inverse des lipides et donc du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il sera éliminé. L'estrogène augmente en fait l'expression de l'Apo A-1 qui est l'une des principales apolipoprotéines constituants les HDLs (35).

Malgré tous ces rôles bénéfiques, l'un des effets les plus importants et néfastes des estrogènes est leur action mitogénique dans les tissus sensibles aux hormones telles que le sein, l'ovaire et l'utérus. Comme mentionné précédemment, une exposition prolongée des tissus cibles à l'estrogène a longtemps été considérée comme un facteur étiologique important pour l'induction de cancers hormono-dépendants (36-39).

Effets positifs

Cerveau

Neuroprotection et différenciation sexuelle

Sein

Lactation et développement à la puberté

Cœur et foie

Rôle protecteur contre l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires

Ovaires

Cycle menstruel

Utérus

Maturation du l'utérus
Et implantation du fœtus

Vagin

Maturation du vagin

Os

Maintien de la densité osseuse

Effets négatifs

Sein

Augmentent les risques du cancer du sein

Utérus

Augmentent les risques du cancer de l'utérus

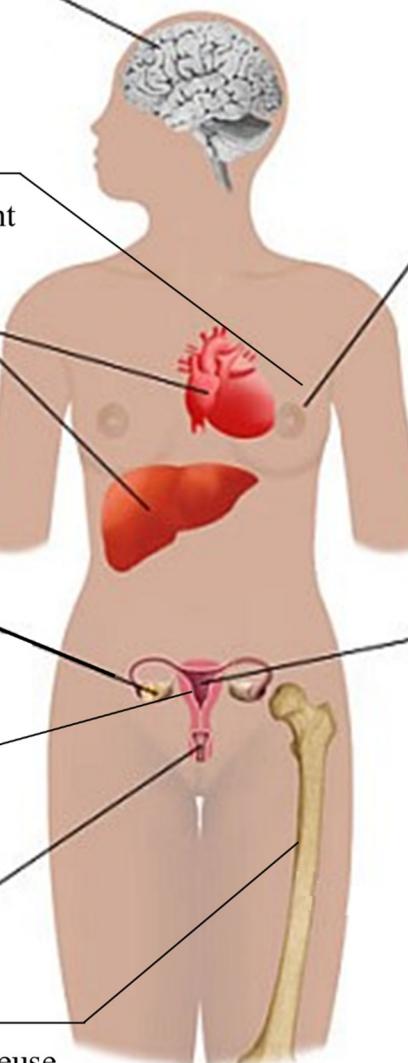


Figure 2. Effets positifs et négatifs des estrogènes sur leurs tissus cibles chez la femme. Adaptée de la référence (40).

3 Les récepteurs des estrogènes : médiateurs de la signalisation cellulaire

Les récepteurs des estrogènes (ERs) sont des facteurs de transcription appartenant à la grande famille des récepteurs nucléaires activés par un ligand. Cette superfamille compte 48 récepteurs nucléaires. La comparaison de leurs séquences ainsi que les analyses phylogénétiques ont permis de les regrouper dans six classes, dont les membres comprennent entre autres le récepteur de la progestérone (PR), de l'acide rétinoïque (RAR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et de la vitamine D. D'autres récepteurs n'ont pas de ligands endogènes et sont classés dans la catégorie des récepteurs orphelins.

3.1 Découverte des ERs

Bien que l'existence des estrogènes soit connue depuis le début du 20^e siècle, ce n'est qu'en 1960 que l'existence des récepteurs des estrogènes fut mise en évidence pour la première fois par Jensen et Jacobson (41). En utilisant de l'estradiol marqué au tritium, ils ont remarqué qu'il n'était retenu que dans les tissus cibles de cette hormone et émis l'hypothèse de l'existence d'un récepteur pour cette molécule. Isolé et caractérisé par Toft et Gorski en 1966 (42), le gène codant le récepteur des estrogènes a été cloné pour la première fois en 1985, à partir d'une librairie d'ADNc de la lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 (43), puis séquencé en 1986 (44). Une dizaine d'années plus tard, un second récepteur fut découvert chez le rat (45), l'homme (46) et la souris (47), et nommé ER β par opposition au premier récepteur séquencé qui a été alors nommé ER α .

3.2 Les gènes codants les ERs

ER α et ER β sont codés par deux gènes distincts appelés ESR1 et ESR2, localisés sur deux chromosomes différents, 6q25.1 et 14q23-24.1, respectivement. ESR1 et ESR2 sont constitués de 8 exons séparés par 7 introns. L'exon 1 code pour la région A/B, les exons 2 et 3 pour une partie de la région C, toute la région D et une partie de la région E, les exons 3-4 pour le reste de la région E et enfin le dernier exon pour la région F. Le produit étant une protéine de 595 acides aminés (aa) d'environ 66 kDa pour ER α et une protéine de 530 aa, de 60 kDa pour ER β (48). Une des caractéristiques communes aux récepteurs stéroïdiens est que l'expression de leurs gènes serait sous le contrôle de multiples promoteurs (49). La transcription du gène ESR1 est sous le contrôle de 7 promoteurs. L'usage de ces différents promoteurs ainsi que l'épissage alternatif conduit à l'existence de plusieurs transcrits qui diffèrent du récepteur sauvage aussi bien en structure au niveau de la région 5' non traduite, mais aussi en fonction (50). Ces différents promoteurs sont utilisés en fonction du type cellulaire et sont donc impliqués dans le contrôle de l'expression tissulaire d'ER α (51). Trois isoformes d'ER α ont été isolées (Figure 3), un à 46 kDa, qui ne possède pas les premiers 173 aa du récepteur sauvage et il est connu pour antagoniser ces effets prolifératifs dans la lignée cancéreuse MCF-7 (52, 53). Un autre à 36 kDa qui diffère beaucoup du récepteur sauvage car il ne possède pas les domaines AF-1 et AF-2. On le retrouve associé à la membrane plasmique et agit comme dominant négatif d'ER α sauvage et est impliqué dans la résistance au tamoxifène (54). Un troisième isoforme dont l'exon 3 a été délétré (ER α -Δ3) résultant en une partie du DBD manquante, il agit également comme un dominant négatif du récepteur sauvage en formant un hétérodimère avec lui, étant donné qu'il ne peut pas lier l'ADN (55). D'autres variants formés à partir de l'épissage de l'ARNm ont été décrit, mais à savoir s'ils sont exprimés en tant que protéines fonctionnelles n'est pas encore

claire (56). ER β quant à lui, possède 5 isoformes issus de l'épissage alternatif du dernier exon codant le récepteur sauvage, la plupart sont exprimés sous forme de protéines dans divers tissus et lignées cellulaires, ils ne sont pas fonctionnels dans leur forme d'homodimère, mais peuvent s'hétérodimériser avec ER β sauvage et moduler son activité transcriptionnelle (57). ER β 2 (appelé aussi ER β cx) et ER β 5 sont tronqués au niveau de l'AF-2 et se comportent comme dominants négatifs d'ER α (58, 59). ER β 2 ne lie pas l'estrogène et exerce également un effet dominant négatif sur l'activité ligand-dépendante d'ER β (60, 61).

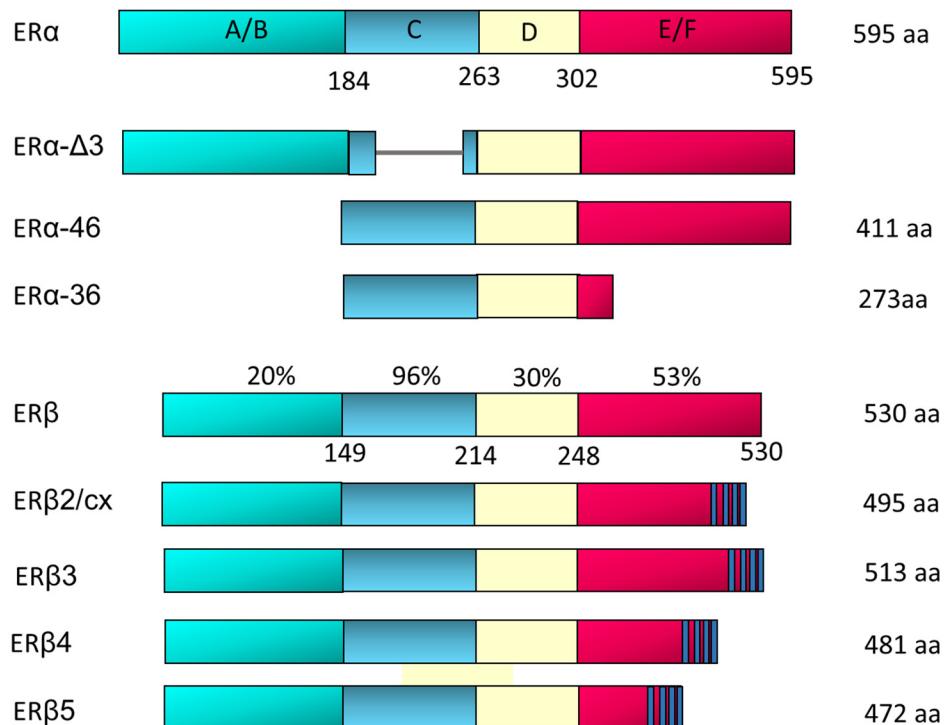


Figure 3. Représentation des différents isoformes d'ER α et ER β . Adaptée de la référence (62).

3.3 Organisation structurale des ERs

Les ERs possèdent une structure modulaire formée de 6 régions distinctes (A-F) (Figure 4). Le domaine N-terminal est constitué par les régions A/B. Il présente une structure désorganisée, c'est pour cette raison que la structure cristalline des ERs n'a pu être réalisée en entier, mais faite individuellement pour chaque domaine. C'est aussi un domaine très variable autant en taille qu'en séquence et très peu conservé entre ER α et ER β avec seulement 15 % d'homologie. C'est cette région A/B qui contient la fonction d'activation de la transcription qui permet l'activation ligand-indépendante des récepteurs appelée AF-1 (activation function 1), via le recrutement de cofacteurs transcriptionnels et dont l'activité est principalement modulée par la phosphorylation (détaillée dans la section 3.4.4.1) (63, 64).

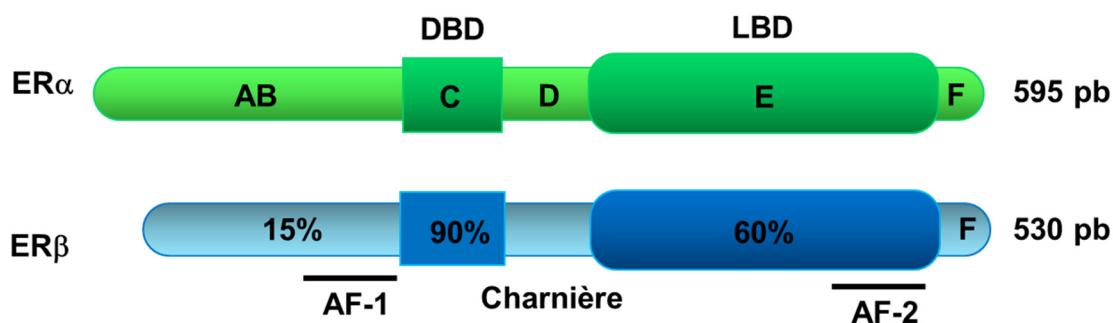


Figure 4. Domaines fonctionnels des récepteurs des estrogènes.

Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) correspond à la région C. Comme son nom l'indique, il permet la liaison du récepteur nucléaire à l'ADN au niveau d'une séquence palindromique spécifique appelée ERE (élément de réponse à l'estrogène) retrouvée sur le promoteur des gènes cibles, en plus de jouer un rôle dans la dimérisation. Ce rôle bivalent est

rendu possible grâce à sa structure contenant deux motifs à doigt de zinc qui vont s'intercaler dans l'ADN pour permettre l'encrage du récepteur au niveau du ERE. C'est le domaine le plus conservé entre tous les récepteurs nucléaires avec 90 % d'homologie entre ER α et ER β , ce qui suggère que les deux récepteurs peuvent se fixer sur la même séquence (65, 66).

Le domaine D est une région charnière qui confère une certaine flexibilité à la structure des ERs, ce qui leur permet de bien positionner leurs domaines et de lier l'ADN. Il contient en particulier des sites pour des modifications post-traductionnelles principalement l'acétylation et la sumoylation ainsi que des signaux de localisation nucléaire (67).

Le domaine de liaison du ligand (LBD) correspond aux régions E/F, c'est le domaine le plus important, car de par son rôle évident dans la liaison du ligand, il joue également un rôle dans la dimérisation et contient la fonction d'activation de la transcription (AF-2) dépendante du ligand. Il est aussi impliqué dans la localisation nucléaire et l'association avec la protéine de choc thermique Hsp90 (Heat shock protein). En reconnaissant l'hormone, il assure la spécificité et la sélectivité de la réponse physiologique (68, 69). La structure du domaine AF-2 est très ordonnée contrairement à celle du domaine N-terminal. Il contient les hélices 3, 4, 5 et 12, si les trois premières restent inchangées, la structure cristallographique aux rayons X de ce domaine a révélé que l'hélice 12 va adopter différentes conformations selon que le ligand soit un agoniste ou un antagoniste (70). Ainsi en présence de l'agoniste, l'hélice 12 va se positionner sur la cavité de liaison du ligand et la refermer comme un couvercle, pour générer une fonction AF-2 compétente tout en formant un sillon hydrophobe favorable au recrutement de coactivateurs transcriptionnels, afin de faciliter l'activation de la transcription. En revanche, l'antagoniste ne

permet pas le bon positionnement de l'hélice 12 au-dessus de la cavité et empêche l'activation du domaine AF-2 en favorisant l'interaction des ERs avec les corépresseurs (Figure 5) (71, 72).

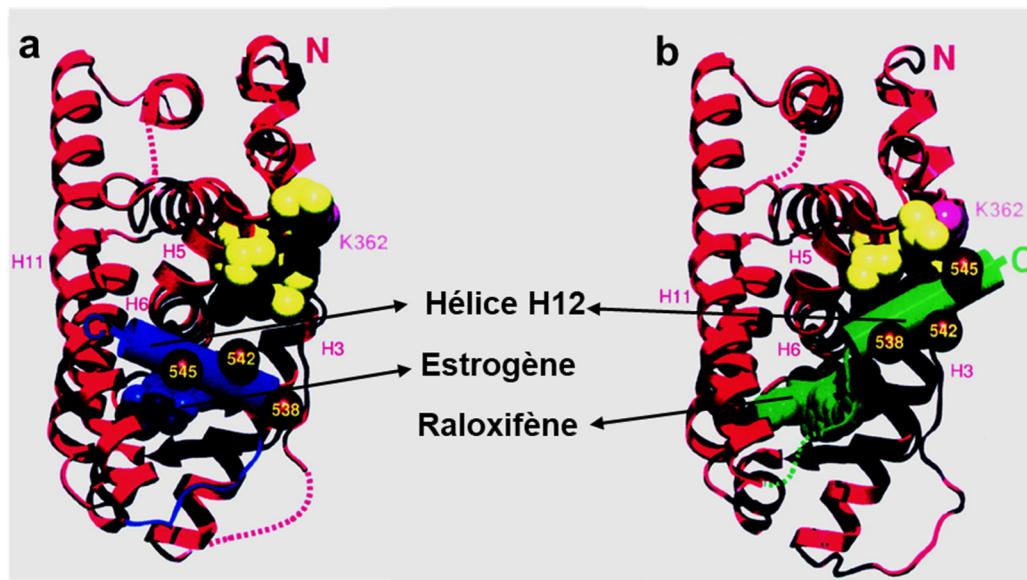


Figure 5. Structure du LBD d'ER α déterminée aux rayons X.

L'hélice 12 dont la position varie en fonction du ligand est représentée par un cylindre bleu dans le cas de la liaison avec l'estrogène (a) et en vert en cas de liaison avec l'anti-estrogène raloxifène (b). Adaptée de la référence (71).

3.4 Mécanismes d'action des ERs : dualité de fonction, récepteurs et facteurs de transcriptions

3.4.1 Mécanisme d'action classique

Les ERs sont des facteurs de transcription activés par le ligand. Ils reçoivent le signal hormonal et le transmettent en agissant sur la transcription des gènes cibles et induisent ainsi les effets biologiques de l'estrogène sur l'organisme. Cette activité transcriptionnelle est médiée

par les domaines de transactivation AF-1 et AF-2, accompagnée d'un recrutement des ERs sur le promoteur des gènes cibles directement au niveau des EREs.

3.4.1.1 Activation des ERs : du ligand à la liaison à l'ADN

En l'absence d'estrogènes, les ERs sont majoritairement présents dans le noyau sous forme de monomères associés à un complexe de protéines chaperonnes comprenant les protéines de choc thermique Hsp90 et les immunophilines. Les immunophilines sont des protéines ubiquitaires et conservées qui lient les immunosuppresseurs tels que la rapamycine et la cyclosporine A. Tous les membres de cette famille possèdent une activité peptidyl prolyl isomérase (PPIase) suggérant qu'ils jouent un rôle dans le repliement protéique. Grâce à cette propriété, les immunophilines forment avec les protéines de choc thermiques un complexe qui permet le maintien des récepteurs des estrogènes dans un état inactif en absence d'hormone et ce en masquant leur domaine de liaison à l'ADN (73, 74). La liaison de l'estrogène provoque un changement de conformation des ERs qui induit leur dissociation des Hsps, leur dimérisation, et par conséquent leur liaison à l'ADN au niveau des éléments de réponse aux estrogènes (EREs) (Figure 8A). Plus précisément, c'est au niveau du LBD que se produit ce changement de conformation, qui fait passer les ERs à une forme transcriptionnellement active grâce à l'activation du domaine AF-2. Ceci se traduit par un repositionnement de l'hélice 12 qui en absence du ligand pointe vers l'extérieur, va cette fois se replier sur elle-même et former une poche hydrophobe permettant le passage des ERs à une forme transcriptionnellement active, et le complexe ER-E2 se lie au promoteur via son DBD. Enfin, ces modifications conformationnelles vont permettre aussi l'exposition des sites de fixation sur les ERs pour les coactivateurs ou les corépresseurs qui seront recrutés et qui vont induire une augmentation ou

une diminution du niveau d'ARNm et des protéines associées, se traduisant finalement par une réponse physiologique au niveau des tissus cibles (75, 76).

3.4.1.2 L'interaction directe ERs-ERE

Les récepteurs nucléaires sont subdivisés en trois classes en fonction de leurs propriétés de liaison à l'ADN. Les récepteurs de classe I représentés par les récepteurs des hormones stéroïdiennes dont les ERs font partie et comprennent aussi le récepteur des androgènes (AR), des minéralocorticoïdes (MR) de la progestérone (PR) et des glucocorticoïdes (GR). Ils se lient à l'ADN sous forme d'homodimère sur un élément de réponse organisé en deux séquences inversement répétées. Les récepteurs de classe II comprennent le récepteur de la vitamine D (RVD), le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), le récepteur X rétinoïde (RXR), le récepteur activé par les proliférateurs du peroxysome (PPAR), le récepteur X du foie (LXR) et le récepteur thyroïde (TR). Ils se lient soit sous forme d'hétérodimère ou d'homodimère avec le RXR. La troisième classe est représentée par les récepteurs orphelins reliés à l'estrogène (ERR) qui se lient sous forme de monomères (Figure 6) (77).

Les ERs appartiennent à classe I et se lient à la séquence ERE, interaction rendue possible grâce à leur domaine DBD. La séquence consensus de l'ERE a été décrite pour la première fois à partir de celle retrouvée sur le promoteur vitellogenin A2 du *Xenopus laevis* (78, 79). La comparaison de 23 éléments de réponse fonctionnels a permis de définir un ERE consensus. Il s'agit d'une séquence palindromique parfaite et inversée de 13pb, organisée en deux hexamères, séparés par trois nucléotides de séquence aléatoire : 5'-GGTCAnnnTGACC-3' (80). Le génome humain contient environ 60.000 EREs, 1 par 43Kb d'ADN, toutefois, seuls quelques gènes régulés par les ERs possèdent un ERE parfait, pour la plupart ce sont des EREs imparfaits, non

palindromiques tel que celui retrouvé sur le promoteur du gène pS2 (81), ou bien le demi-ERE du promoteur de la cathepsine D (82). Les ERs se lient au ERE du vitellogenin A2 du *Xenopus laevis* avec une grande affinité plus que sur n’importe quel autre ERE, sachant que plus l’ERE est différent de la séquence consensus, plus faible sera sa liaison aux ERs et son activité transcriptionnelle. Le ERE peut aussi bien se retrouver au niveau de la région promotrice proximale, ou à 5Kb en amont du site d’initiation de la transcription ou encore sur des sites régulateurs distaux (75, 83).

La spécificité de liaison à l’ADN est assurée par la séquence primaire d’acides aminés de l’hélice de reconnaissance de l’ADN. En particulier, les trois acides aminés de la P-box sont impliqués dans la spécificité de liaison des récepteurs nucléaires. Cette hélice de reconnaissance de l’ADN comporte aussi une D-box, dont les acides aminés sont impliqués dans la dimérisation des récepteurs stéroïdiens (Figure 7) (84, 85).

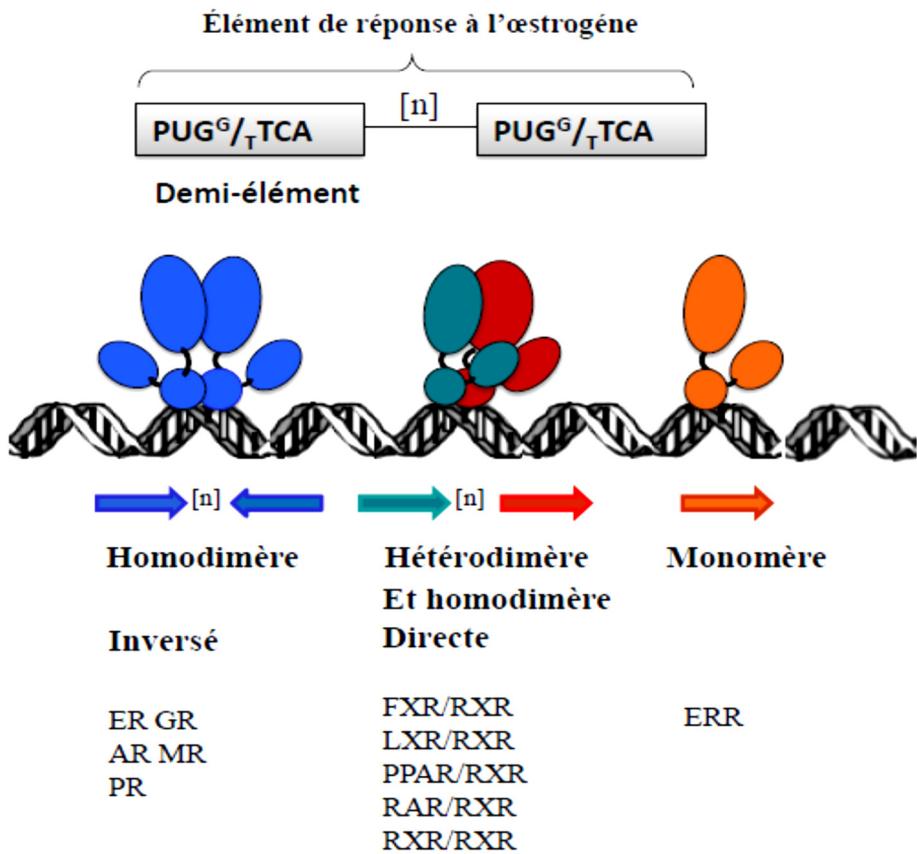


Figure 6. Les différents types d'éléments de réponse à l'estrogène reconnus par les ERs.

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

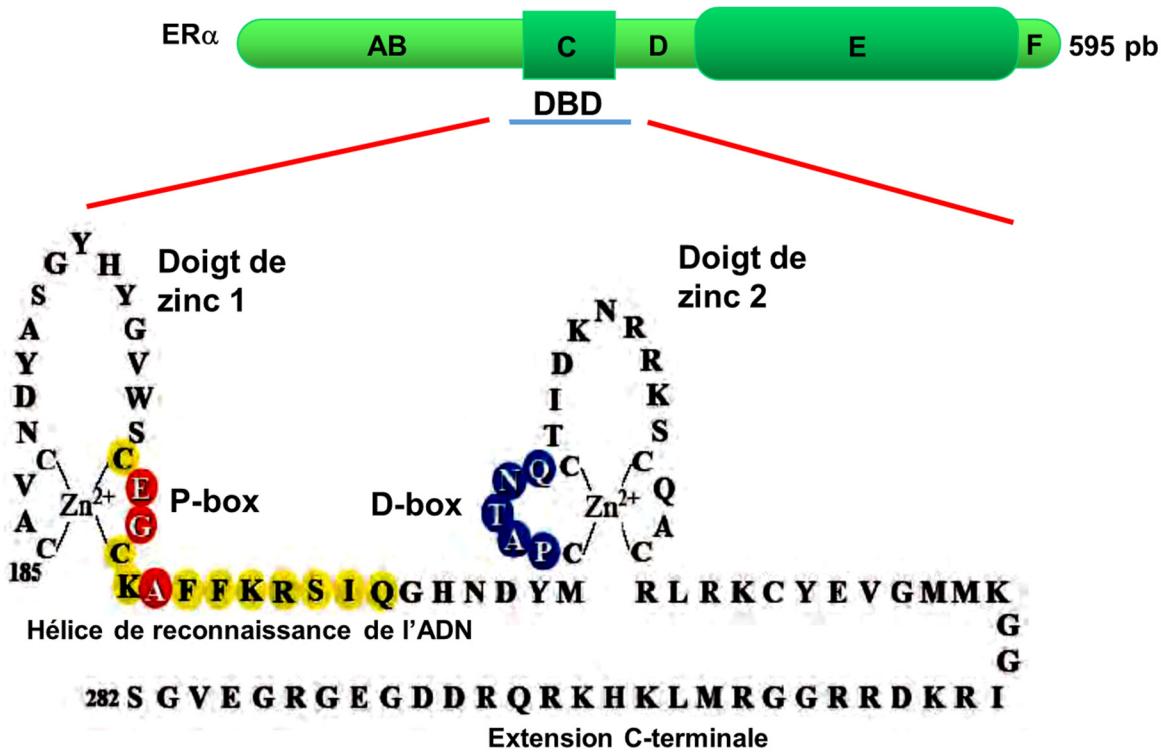


Figure 7. Représentation schématique de la séquence du domaine de liaison à l'ADN des ERs.

Le DBD est composé de deux doigts de zinc à quatre cystéines. Les acides aminés de reconnaissance de l'ADN sont représentés en jaune, ceux de la P-box en rouge et la D-box en bleu. Adaptée de la référence (76).

3.4.1.3 Modèle dynamique de la transcription des gènes estrogènes-dépendants par ER α

Une fois activé par le ligand et lié à l'ADN au niveau des EREs, le récepteur commence par recruter le complexe SWI-SNF, qui va remodeler la chromatine de façon ATP-dépendante (86, 87). Le recrutement d'ER α à l'ADN est suivi presque immédiatement par le recrutement du complexe CBP/p160, induisant une augmentation de l'acétylation des histones (88, 89). Le complexe CBP/p160 participe à son tour au recrutement des méthyltransférases, PRMT1/2 ou

CARM1 (90). Ces différents complexes recrutés ont tous pour but le remodelage de la chromatine vers une conformation plus ouverte et faciliter ainsi le recrutement d'autres cofacteurs. Le complexe médiateur est alors recruté, facilitant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle basale, dont la RNA polymérase II (Pol II) (91-93). Il est par la suite remplacé par le complexe élongateur. Quarante minutes environ sont nécessaires au recrutement de tous ces nombreux coactivateurs transcriptionnels. Néanmoins, les réponses estrogéniques doivent être limitées dans le temps, afin que les cellules puissent détecter l'estrogène, y répondre, puis cesser la réponse. C'est pourquoi un complexe répresseur, formé par les protéines de choc thermique ainsi que des sous-unités du protéasome, est recruté au niveau du promoteur actif. Le récepteur des estrogènes est alors dégradé après avoir activé la transcription de ses gènes cibles. Il a été déterminé que ces différentes protéines ne se retrouvent pas toutes en même temps avec le récepteur sur l'ADN, mais sont recrutées de façon ordonnée. Deux équipes ont utilisé la technique d'immunoprecipitation de la chromatine (ChIP) pour déterminer la séquence des événements qui mènent à l'activation de la transcription du gène pS2 (TFF1) (94, 95) et du gène de la cathepsine D (CATD) (95) par ER α dans les cellules MCF-7, et ont mis en évidence un modèle de recrutement ordonné et cyclique de cofacteurs au niveau des promoteurs de ces deux gènes. Cet échange de cofacteurs mène à la transcription et à la dégradation du récepteur des estrogènes ER α et permet ainsi à la cellule d'adapter constamment le niveau de transcription d'un gène, en réponse aux différentes situations en limitant la durée de son activation.

3.4.2 Mécanismes d'action non classiques

3.4.2.1 Mécanisme d'action ERE-indépendant : interaction indirecte ERs-ADN

Le fait que de nombreux gènes soient régulés par les ERs sans pour autant posséder de séquences EREs au niveau de leurs promoteurs a mis en évidence l'existence d'un mécanisme d'activation ERE-indépendant. Il a ainsi été démontré que les ERs peuvent également se lier indirectement à l'ADN, à travers des interactions protéine-protéine, c'est-à-dire que le récepteur va s'associer à un autre facteur de transcription qui lie l'ADN, ce qui contribue à augmenter la multitude de gènes pouvant être régulé par les ERs (Figure 8B). Les ERs sont connus pour activer la transcription au niveau des sites de liaison AP1 (Activating Protein 1) qui lient les facteurs de transcription Fos/Jun formant un complexe nommé AP-1 présent sur le promoteur de gènes impliqués dans la croissance, la différenciation et le développement (96, 97). Cependant, même si les ERs ne lient pas directement l'ADN, le DBD reste nécessaire pour l'activation de la transcription via le complexe AP1, ce qui démontre l'importance du DBD dans les interactions protéine-protéine. Sp1 (Specificity protein 1), est un autre facteur de transcription avec lequel les ERs interagissent et qui lie l'ADN au niveau de séquences riches en motifs GC, présents sur les promoteurs de nombreux gènes qui répondent à l'estrogène. Le facteur de transcription Sp1 est connu pour son rôle dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (98, 99). NF-κB (Nuclear Factor kappa B), FoxA1, egr-1 (early growth response 1), GATA-3 (GATA binding protein 1), CREB (cAMP response element-binding protein) sont d'autres facteurs de transcription connus et avec lesquels les ERs interagissent (100, 101). Ce mécanisme fait aussi intervenir le recrutement de corégulateurs sur les ERs. De plus, les ERs peuvent réguler la transcription au niveau d'un promoteur possédant à la fois des demi-EREs à proximité de sites de liaisons pour d'autres facteurs de transcription tels que les Sp1 (102-104).

3.4.2.2 Mécanisme d'action E2-indépendant

Il existe d'autres voies de signalisation pouvant activer les ERs mêmes en absence d'hormone, notamment la phosphorylation des ERs au niveau de leur AF-1, qui est un mécanisme important, menant à l'activation E2-indépendante. Ce concept a été découvert en 1990, lorsque l'administration d'EGF (Epidermal Growth Factor) à des souris adultes ovariectomisées a induit des effets similaires à ceux observés en réponse à l'estrogène (105). Ceci a révélé l'existence d'autres voies de transduction pouvant activer les ERs même en absence d'hormone, particulièrement les facteurs de croissance tels que l'EGF, l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) ou encore le TGF- β (Transforming Growth Factor beta). Ces voies de signalisation sont induites par les récepteurs membranaires incluant la famille des récepteurs tyrosine kinase (RTK) et certains récepteurs couplés aux protéines G, notamment le récepteur des chimiokines CXCR4. Leur activation par les facteurs de croissance enclenche plusieurs cascades signalétiques qui mènent à l'activation de plusieurs kinases incluant les MAPKs Erk1/2, p38 et Jnk, PI3K/Akt et les protéines kinases (PKA et PKC), qui vont à leur tour induire la phosphorylation des ERs au niveau de l'AF-1 et réguler leur activité transcriptionnelle (Figure 8C) (106-109). Il est à noter aussi que l'activation E2-dépendante et indépendante ne sont pas exclusives et peuvent exercer un effet synergique sur les deux domaines d'activation AF-1 et AF-2 (110).

3.4.2.3 Mécanisme d'action non génomique : effets rapides des estrogènes

Le fait que certaines actions de l'estrogène médiées par les ERs se produisent dans un laps de temps très court a révélé l'existence d'une voie non génomique (non transcriptionnelle). Ceci a notamment été observé après que le traitement de rates ovariectomisées avec l'estrogène ait induit une augmentation du niveau de l'AMPc au bout de 15 min d'exposition (111). Il s'agit

donc d'un effet très rapide ne nécessitant que quelques secondes voire quelques minutes contrairement à la voie génomique qui requiert quelques heures et n'est pas abolie par les inhibiteurs de la transcription tels que l'actinomycin D ou la cycloheximide (112). La voie non génomique est médiée par une population de ERs cytoplasmiques ou présents dans et/ou proche de la membrane plasmique. Ne contenant pas de domaine transmembranaire, la capacité des ERs à s'associer à la membrane est due à des interactions protéines-protéines avec des protéines membranaires spécifiques comme la calvéoline-1 (113) ou avec la protéine adaptatrice Src homology 2 domain containing (Shc) (114) ou encore grâce à une modification post-traductionnelle soit la palmitoylation qui consiste en l'attachement d'une longue chaîne d'acide gras qui permet de cibler les protéines à la membrane plasmique en permettant leur interaction avec les radeaux lipidiques (115). ER α membranaire est notamment connu pour être palmitoylé sur un résidu cystéine C447 par l'enzyme PAT (palmitoyl acyltranférase) (116, 117). Les MAPKs, les kinases Src (118-120), PI3K/Akt (121), caveoline-1 (122), les récepteurs membranaires : IGF-1R, EGFR, ErbB2(123, 124), la protéine adaptatrice Shc (125) et les protéines G (126), font toutes partie des protéines pouvant être activées en interagissant avec ces ERs cytoplasmiques, elles vont à leur tour réguler l'expression des gènes via l'activation de différents facteurs de transcription (Figure 8D) (118-121, 123). Ceci indique finalement la convergence des deux voies génomiques et non génomiques (127, 128).

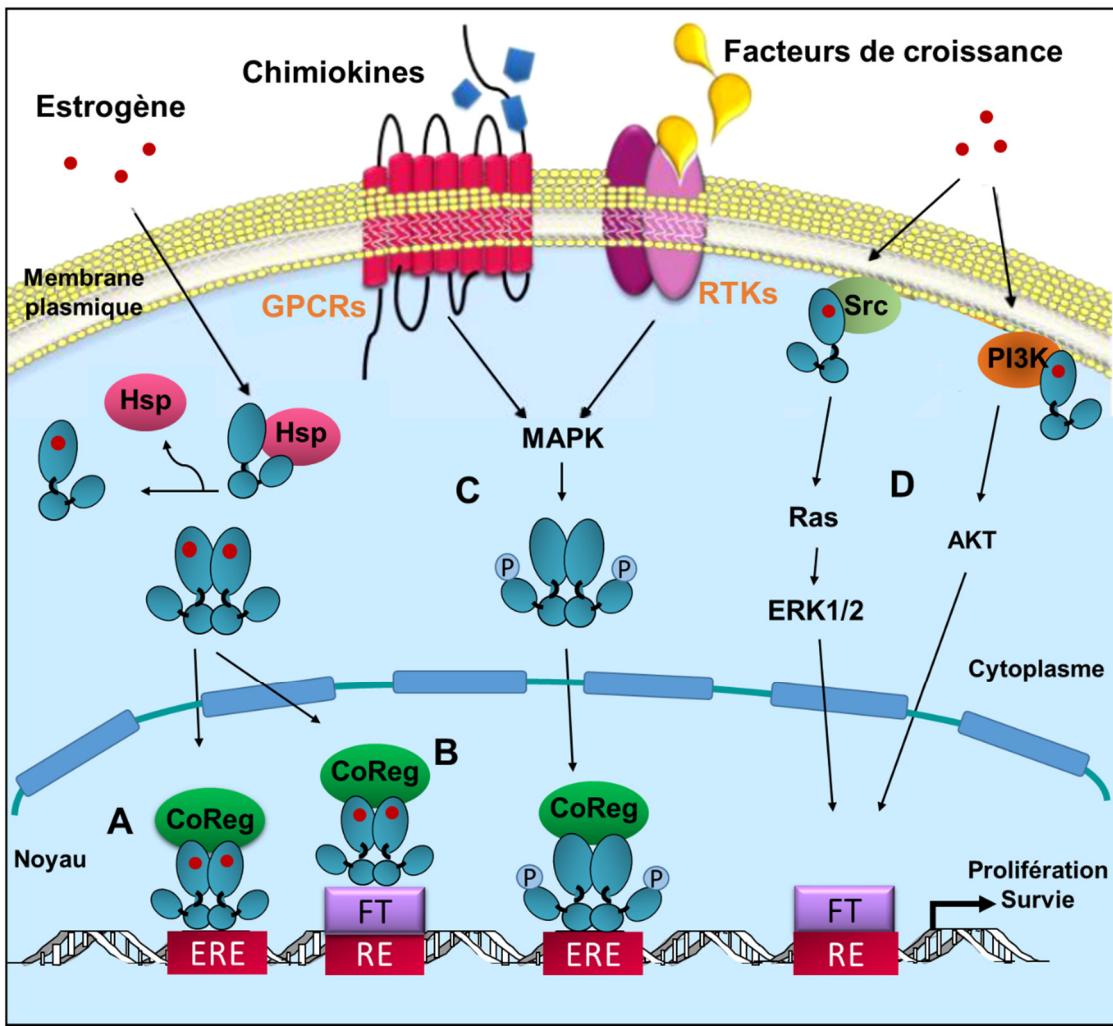


Figure 8. Résumé des différents mécanismes d'action des ERs. Adaptée de la référence (129).

3.4.3 Les corégulateurs transcriptionnels

Il est bien établi que les récepteurs des estrogènes régulent l'expression d'une multitude de gènes, mais comment peuvent-il activer la transcription de certains gènes et en réprimer d'autres ? Le fait que leur action soit tissus spécifiques indique qu'ils ne fonctionnent pas de manière isolée. En effet, ce rôle bivalent est rendu possible grâce à leur interaction avec deux classes de corégulateurs : les coactivateurs et les corépresseurs qui sont recrutés sur les ERs

(Figure 9), mais pas seulement, car qui dit expression de gènes, implique tout un vaste complexe de facteurs à commencer par l'ARN polymérase II et les composants de la machinerie transcriptionnelle de base, accompagnés d'un remodelage de la chromatine et de modifications des histones. À ce jour près de 300 corégulateurs ont été identifiés et leur nombre ne cesse d'augmenter, attestant de leur rôle omniprésent dans la régulation de la transcription.

3.4.3.1 Les coactivateurs

Ce sont les modulateurs positifs de l'activité transcriptionnelle des ERs. Chez les eucaryotes, l'ADN est empaqueté sous forme de chromatine, le nucléosome étant son unité fondamentale, formée d'un octamère de 4 cores d'histones autour desquels l'ADN est enroulé. Ces nucléosomes sont ensuite compactés en une structure dense et très organisée appelée chromatine (130). Pour que la transcription soit initiée, il faut que le promoteur soit accessible à la machinerie transcriptionnelle, ceci fait intervenir un groupe de coactivateurs formant un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant qui vont changer l'organisation des nucléosomes, tels que la famille Swi/Snf (switching mating type/sucrose non fermenting). Il y a aussi ceux qui vont induire des modifications covalentes des histones afin de décondenser la chromatine tel que la famille PRMT1 (Protein Arginine Methyl Transferase 1) ou CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyl Transferase 1) et qui possèdent (ou recrutent) des activités enzymatiques capables de modifier la chromatine tels que les acétylases et les méthylases (131-133). Ces coactivateurs sont considérés comme étant secondaires puisqu'ils ne lient pas les ERs, mais sont recrutés indirectement en s'associant aux coactivateurs principaux qui interagissent directement avec les ERs et sont impliqués dans leur activité transcriptionnelle. Ils sont recrutés soit au niveau de l'AF-1 et/ou de l'AF-2 (90).

Les premiers partenaires des ERs ont été identifiés par Halachmi et ses collaborateurs, qui ont utilisé le domaine LBD d'ER α lié à l'estrogène, pour purifier deux protéines de 140 et 160 kDa appelées ER α Associatied Protein 140 et 160 (ERAP 140 et ERAP 160) et dont l'interaction avec ER α requiert un domaine AF-2 intact (134). Ce n'est qu'après le clonage et la caractérisation du Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC1), qu'un rôle spécifique pour cette classe de protéine fut établi. SRC1 a d'abord été identifié par essai de double hybride en utilisant le domaine LBD du récepteur des progestérones comme appât. Il a ensuite été démontré que SRC1 interagissait avec ER α et qu'il augmentait son activité transcriptionnelle de manière ligand dépendante (135). Le clonage de SRC1 a par la suite permis de découvrir une famille de coactivateurs ayant des homologies structurelles et fonctionnelles avec SRC1 et a été appelée famille des p160, elle est composée de trois membres : SRC1 (ou NCoA1), SRC2 (ou GRIP1, TIF2, NCoA2) et SRC3 (ou AIB1, ACTR, p/CIP, RAC3, TRAM1, NCoA3). Ces coactivateurs ont aussi des activités d'histone acétyltransférases (HAT) qui permet un remodelage plus aisément de la chromatine au niveau des gènes cibles (136).

En plus du motif LXXLL (L=Leucine et x étant n'importe quel aa) aussi appelé nuclear box (NR-box) (NR-box 1 à 3) qui leurs permet de lier le domaine AF-2 des ERs en présence du ligand (137), les SRCs sont dotés de domaines C-terminal d'activation de la transcription (AD1 et AD2) et d'un domaine N-terminal à motif bHLH/PAS (basic Helix Loop Helix/PAS). Ainsi AD1 va recruter d'autres coactivateurs à activité histones acétyltransférases comme CBP (CREB Binding Protein) et p300 dans le cas d'ER α tandis que AD2 interagit avec des arginines méthyltransférases PRMT ou CARM1. Tous ces cofacteurs travaillent de façon synergique afin de potentialiser l'activité des ERs (138-140).

En plus d’interagir avec l’AF-2 des ERs, certains coactivateurs peuvent aussi s’associer à la région AF-1. Par exemple, les coactivateurs de la famille SRC et CBP/p300 en plus de s’associer à l’AF-2, lient aussi la région AF-1 d’ER α et ER β de façon ligand-indépendante (141-143). Steroid receptor RNA activator (SRA) est aussi recrutés sur l’AF-1, il augmente l’activité AF-1 des ERs et autres récepteurs nucléaires (144). Plus récemment notre laboratoire a démontré le recrutement de l’ubiquitine ligase E6-AP sur l’AF-1 d’ER β pour réguler son activité ligand-indépendante (145).

3.4.3.2 Les corépresseurs

Le fait que tous les ligands naturels connus des ERs soient des agonistes suggère que le rôle de ces facteurs de transcription est d’activer l’expression de leurs gènes cibles. L’existence de coactivateurs qui amplifient leur activité est donc tout à fait justifiée. Toutefois, les taux physiologiques d’estrogènes circulants dans le corps sont fluctuants, et élevés dans les tissus comme l’ovaire où ils peuvent conduire à une activation accrue des ERs. C’est pourquoi, comme les coactivateurs augmentent l’activité des ERs, il a été identifié des corépresseurs capables d’atténuer leur activité transcriptionnelle et de limiter ainsi la réponse hormonale.

Les corépresseurs les plus étudiés et les mieux caractérisés sont SMRT (Silencing Mediator of Retinoic and thyroid hormone Receptors) et NCoR (Nuclear Hormone Corepressor). Ils ont été identifiés initialement comme étant recrutés au niveau des récepteurs nucléaires non stéroïdiens tels que le récepteur des hormones thyroïdes (thyroid hormone receptor (TR)) et du récepteur de l’acide rétinoïque (retinoid activated receptor (RAR)) en absence d’hormone pour les maintenir dans un état inactif pour se dissocier suite à la liaison du

ligand (146, 147). L’interaction de ces deux corépresseurs avec leurs récepteurs se fait au niveau du LBD grâce à leurs deux motifs protéiques appelés boîtes CoRNR (NR-interacting domains-CoRNR boxes) dont le motif est proche des séquences LXXLL caractéristiques des coactivateurs (148). Comme les coactivateurs, les corépresseurs NCoR et SMRT recrutent des corépresseurs secondaires qui leur permettent d’exercer leur effet répressif en remodelant la chromatine, tels que les HDACs (histones désacétylases) et mSin-3 (149).

Tant dès que NCoR et SMRT répriment l’activité de nombreux récepteurs nucléaires en absence de ligand, leur interaction avec les ERs est purement pharmacologique. En effet, NCoR et SMRT sont recrutés sur les ERs en présence des agonistes partiels, tamoxifène et le raloxifène, leurs permettant ainsi d’exercer leur rôle d’antagoniste dans les cellules cancéreuses mammaires (95, 150).

Des expériences de transfection transitoire de NCoR et de SMRT ont montré que ces protéines étaient capables de supprimer l’activité agoniste du tamoxifène (151). Inversement, l’injection d’anticorps contre les protéines NCoR ou SMRT permet d’intensifier l’activité agoniste du tamoxifène (152). De la même manière, le tamoxifène devient un puissant agoniste d’ER α dans des fibroblastes de souris KO pour NCoR (153). L’ensemble de ces résultats démontrent que le NCoR et SMRT ont peu d’impact sur ER α lié à l’estradiol, en revanche ils sont capables de réprimer l’activité agoniste des antagonistes partiels d’ER α tels que le tamoxifène et le raloxifène.

Il existe cependant des corépresseurs physiologiques pour les ERs. Un corépresseur récemment décrit nommé REA (Repressor of Estrogen Receptor Activity) a été identifié par essai de double hybride dans les MCF-7. C’est un corépresseur spécifique d’ER α puisqu’il n’a

aucun effet sur les autres récepteurs nucléaires stéroïdiens et non stéroïdiens. Il est recruté au niveau du LBD des ERs, par contre bien qu'il possède le motif LXXLL, celui-ci n'est pas impliqué dans l'interaction avec les ERs. Il inhibe la réponse d'ER α à l'estrogène ainsi qu'à la coactivation induite par SRC1 en rentrant en compétition avec lui pour la liaison sur ER α . Cet effet répresseur est observé aussi bien lorsqu'ER α est lié directement au promoteur au niveau du ERE ou bien indirectement via un autre facteur de transcription. Enfin, le REA potentialise aussi l'effet antagoniste de l'anti-estrogène tamoxifène (154, 155).

Un autre corépresseur qui atténue l'activation des ERs en réponse à l'estrogène, le RIP140 (Receptor-Interacting Protein 140). Ayant des motifs LXXLL, il s'associe à ER α lié à son ligand l'estrogène, au niveau de la région AF-2 et empêches ainsi l'accès aux coactivateurs qui interagissent avec cette région d'ER α . De plus, RIP140 peut réduire l'activité transcriptionnelle basale d'ER α en s'associant à des complexes de HDACs (156, 157). Il y a aussi le LCoR (ligand-dependent corepressor) qui interagit également via son motif LXXLL et recrute les HDACs et un autre corépresseur, CtBPs (C-terminal binding proteins) (158).

En résumé, l'activité transcriptionnelle des ERs est régulée par toute une panoplie de corégulateurs, coactivateurs comme corépresseurs (Figure 9), qui travaillent de concert et lui permettent ainsi de jouer plusieurs rôles autant physiologiques que pathologiques qu'on leur connaît. Sans oublier aussi les modifications post-traductionnelle telles que la phosphorylation, la méthylation, la sumoylation, l'ubiquitination qui viennent ajouter un degré de complexité à la régulation de la l'expression de gènes par les ERs. La surexpression ou l'absence d'un seul de ces corégulateurs peut induire une variation de l'expression du gène cible et entraîner le développement de maladies telles que cancer du sein (110, 159) .

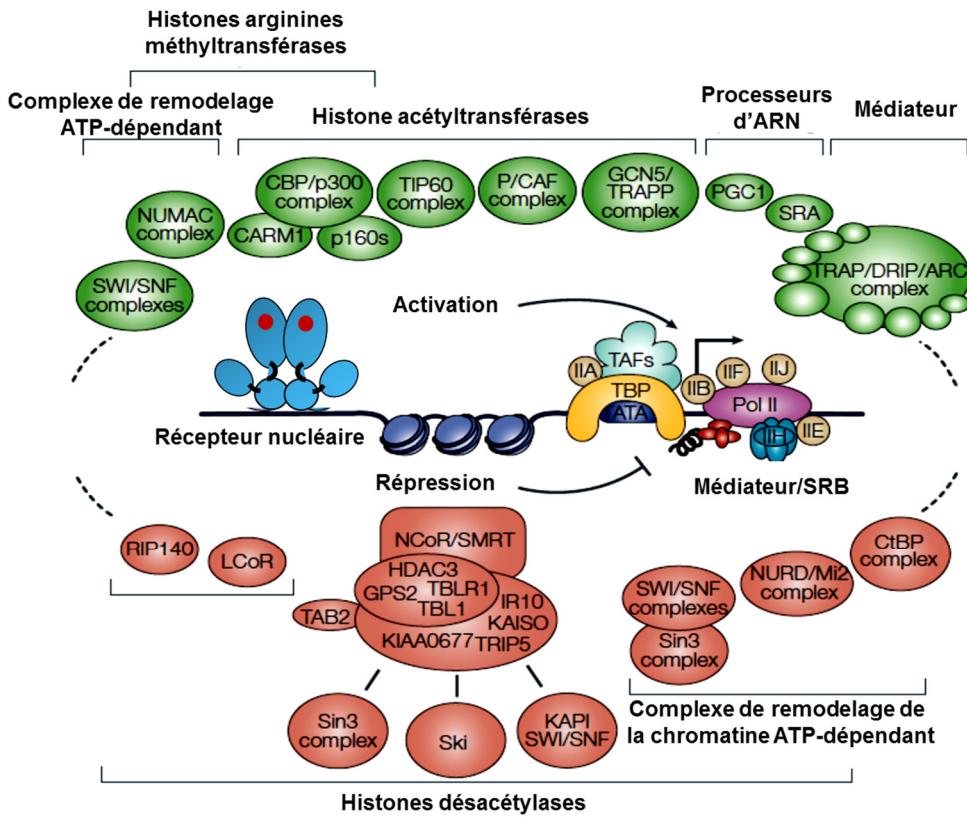


Figure 9. Représentation des différents coactivateurs et corépresseurs impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs. Vert : coactivateurs. Rouge : corépresseurs. Adaptée de la référence (160).

3.4.4 Régulation de la l'activité des ERs par les modifications post-traductionnelles

Comme toute protéine, les ERs sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles qui vont moduler leur activité transcriptionnelle. Les ERs peuvent ainsi être phosphorylés, acétylés, ubiquitinylés, sumoylés et palmitoylés (129). Ces modifications auront un impact non seulement sur l'activité transcriptionnelle des ERs, mais aussi sur la stabilité de

la protéine, sa localisation cellulaire, sa dimérisation, sa liaison à l’ADN, la sensibilité au ligand et l’interaction avec les corégulateurs transcriptionnels.

3.4.4.1 La phosphorylation des ERs

La phosphorylation est sans contredit la modification la plus étudiée sur les récepteurs stéroïdiens. C'est un processus enzymatique hautement dynamique et réversible qui consiste en l'ajout covalent d'un groupement phosphate, provenant de L' adénosine triphosphate (ATP), sur un acide amine (serine, thréonine ou tyrosine) d'une protéine cible (161). Cette réaction est catalysée par des kinases et la déphosphorylation implique l'action de phosphatases (162). Elle régule aussi bien l'activation des ERs par les estrogènes au niveau de l'AF-2 que leur activation ligand-indépendante sur l'AF-1. Ceci se produit en réponse à plusieurs kinases, incluant entre autres les MAPKs (Erk1/2 et p38), PI3K/Akt, GSK-3, PKA et PKC. Ces kinases sont les protéines effectrices de différentes voies de signalisation pouvant être activées en réponse à plusieurs stimuli intracellulaires et/ou molécules signalétiques.

Les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor), IGF (insulin-like growth factor) et héreguline (HRG) induisent l'activation de leur récepteur transmembranaire EGFR (ErbB1), ErbB2/ErbB3 et IGF-1R, respectivement, qui font partie de la superfamille des récepteurs tyrosines kinases. Ces protéines transmembranaires possèdent un domaine extracellulaire qui sert à la liaison du ligand et un domaine intracellulaire RTK (receptor tyrosine kinase). Leur activation par les facteurs de croissance entraînera leur transphosphorylation, ce qui induira toute une cascade de signalisation grâce aux tyrosines phosphorylées qui vont servir de site d'encrage pour des protéines signalétiques.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) ont aussi été impliqués dans la régulation de l'activité des ERs. Dépendamment des protéines G couplés aux GPCRs, différentes voies de signalisation seront induites grâce à l'activation et/ou recrutement de protéines telles que l'adenylate cyclase (AC), Src, PLC γ et PI3K (163-165). Dans notre laboratoire, il a notamment été démontré que l'activation du récepteur des chimiokines CXCR4 par la chimiokine SDF-1/CXCL12, active la MAPK Erk1 qui à son tour phosphoryle et active les ERs (166).

La phosphorylation d'ER α est la plus ancienne des MPTs et la plus étudiée aussi. Plusieurs sites, que ça soit au niveau de résidu serines, thréonines ou des tyrosines se trouvant dans toutes les régions qui compose ER α ont été identifiés. La phosphorylation d'ER α peut se produire en réponse à l'estrogène et avoir un effet synergique sur l'activation transcriptionnelle ou bien être indépendante du ligand.

La phosphorylation des serines 104/106 est importante pour l'activité d'ER α . La particularité de cette serine était de n'être phosphorylée que par l'estrogène sans impliquer les facteurs de croissance. GSK3 et Cdk2 (cyclin-dependent kinase 2) sont responsable de la phosphorylation de ces deux serines (167, 168). Plus récemment, la voie des MAPKs a aussi été impliquée dans cette modification, ces serines sont phosphorylées par Erk1/2 en réponse à Ras, à l'estrogène et au tamoxifène (169). Les Ser104/106 sont requises pour l'effet agoniste du tamoxifène, suggérant que ces sites pourraient contribuer à la résistance au tamoxifène dans le cancer du sein (169).

Plusieurs voies sont connues pour réguler l'activation ligand-indépendante d'ER α . Parmi elles, la mieux caractérisée implique l'activation d'ER α par l'EGF. La serine 118 présente au niveau de l'AF-1 d'ER α a été décrite comme étant une cible de la phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance EGF et IGF via l'action de la voie Ras-MAPK (170). Ceci favorise

l’interaction d’ER α avec les coactivateurs SRC-1 et CBP/p300 résultant en l’activation ligand-indépendante du récepteur, et permet ainsi l’activation de la transcription des gènes cibles d’ER α même en absence d’estrogène (171). Cette serine 118 est aussi phosphorylée en réponse à l’estrogène et plusieurs kinases en sont responsables, incluant MAPK (172) , Cdk7 (173) , I kB kinase (IKK α) (174) , GSK-3 (167) et Erk7 (175). La phosphorylation de la ser-118 a aussi été observé en réponse à la prolactine (176) et les ROS (Reactive oxygen species). Dans la plupart des cas la phosphorylation de la serine 118 favorise l’activation d’ER α et est importante dans la régulation des gènes cibles qui sont réprimés en réponse à E2 et au tamoxifène (177).

L’EGF est aussi responsable de la phosphorylation d’ER α au niveau de la serine 167 (S167) et de la tyrosine 537 (Y537). La phosphorylation de la S167 est dépendante de l’action de la kinase p90RSK (p90 ribosomal S6 kinase) et module l’activité du domaine AF-1 d’ER α (178). AKT et S6K1 ont également été impliqué dans la phosphorylation de la serine 167. Il a ainsi été démontré que la phosphorylation de la S167 par AKT active et stabilise ER α (107), tant dis que la phosphorylation de S167 par S6K1, une kinase effectrice de la voie mTOR, active ER α et favorise la prolifération des cellules cancéreuses mammaires ER (+). De plus, les deux voies EGF/ p90RSK et rapamycin 1/mTOR /S6K1 coopèrent pour activer ER α et stimuler la prolifération des cellules cancéreuses (179). Cette serine 167 a d’ailleurs été impliqué dans la résistance au tamoxifène et de son effet agoniste dans le cancer de l’endomètre (180). Quant à la phosphorylation de la tyrosine 537 (Y537), elle régule la liaison de l’estrogène dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 ainsi que la capacité d’ER α à interagir avec des kinases possédant des domaines Src Homology 2 (SH2) (181, 182). Les résultats obtenus des études *in vitro* suggère que des tyrosines kinases Src pourraient être responsables de cette phosphorylation (183). De plus, bloquer l’interaction entre ER α et Src après stimulation de cellules MCF-7 avec

E2 en utilisant un peptide comprenant la Tyr 537 phosphorylée, inhibe la transition G1/S du cycle cellulaire et inhibe aussi la croissance de cellules cancéreuses mammaires dans un modèle animal de xénogreffe (183, 184). Également, la mutation de la Tyr 537 en asparagine, conférant une activation constitutive à ER α , a été observée dans les tumeurs mammaires chez certains patients (185).

Le seul site phosphorylé sur le DBD est la serine S236, elle est phosphorylée par PKA, ce qui régule la dimérisation du récepteur (90). Dans la région charnière, la serine 305 est phosphorylée par deux kinases, p21-activated kinase-1 (Pak1) et PKA. La première augmente l'activité d'ER α tandis que la deuxième est impliquée dans la résistance au tamoxifène (186, 187).

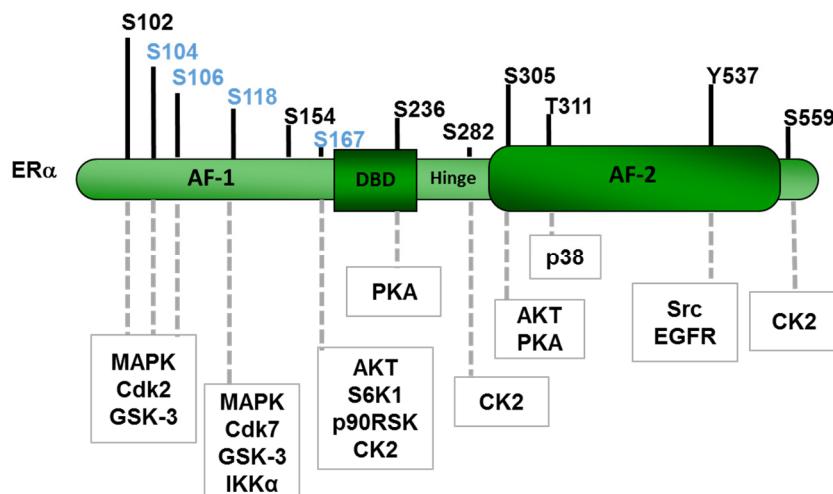


Figure 10. Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER α .
Adaptée de la référence (188).

Bien que la phosphorylation soit aussi importante dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ER β , très peu est connu sur son impact. La plupart des résidus phosphorylés

sur ER β se trouve plus au niveau de son AF-1 et ont été identifiés en premier chez la souris, mais puisqu'il existe une forte homologie entre l'isoforme murin et humain, les effets devraient être conservés.

L'EGF et l'oncogène Ras induisent l'activation ligand-indépendante d'ER β via l'activation des MAPKs Erk1/2 qui phosphorylent les serines 106 et 124, favorisant ainsi le recrutement de coactivateurs SRC-1 et CBP sur l'AF-1 d'ER β (142, 143).

Les séries 106 et 124, sont aussi des cibles de la voie p38. Notre laboratoire a ainsi démontré que l'activation de la voie p38 par l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 réprime l'activité d'ER β dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en affectant le recrutement des coactivateurs sur l'AF-1 (189). De la même façon, l'activation de la voie PI3K/Akt par l'hétérodimère ErbB2/ErbB3 réprime l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante d'ER β en phosphorylant la série 255 présente dans la région charnière d'ER β (190). Plus exactement, l'activation de la voie PI3K/Akt par l'héréguline dirige ER β vers la dégradation par le protéasome en favorisant la formation d'un complexe entre CBP et l'E3-ubiquitine ligase Mdm2. Ce complexe interagit ensuite avec ER β au niveau de la série 255, induisant ainsi l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. En réprimant l'activité d'ER β , héréguline- β réprime l'activation de l'expression des gènes cible PR et CCND1 en réponse à E2 dans les cellules cancéreuses mammaires Hs578T qui exprime stablement ER β , et ce en diminuant le recrutement d'ER β sur le promoteur de ces gènes (191). Notre laboratoire a aussi montré que la série 106 avec la série 94, régule l'activité, la stabilité et la mobilité intra-nucléaire d'ER β . La phosphorylation de ces séries par Erk1/2 favorise le recrutement de l'E3-ligase E6-AP, qui en ubiquitinant le récepteur, induit sa translocation vers la matrice nucléaire et sa dégradation par le protéasome (145).

Finalement, une autre étudiante de notre laboratoire a démontré que la serine 87 (S106 chez la souris) est phosphorylé par Erk1/2 en réponse à la chimiokine SDF-1/CXCL12, le ligand du récepteur CXCR4. La phosphorylation de cette serine augmente l'activité d'ER β et l'expression de ces gènes cibles dont SDF-1 et ce aussi bien en présence ou en absence d'estrogène sur des éléments EREs ou AP-1 et même en réponse au tamoxifène (192).

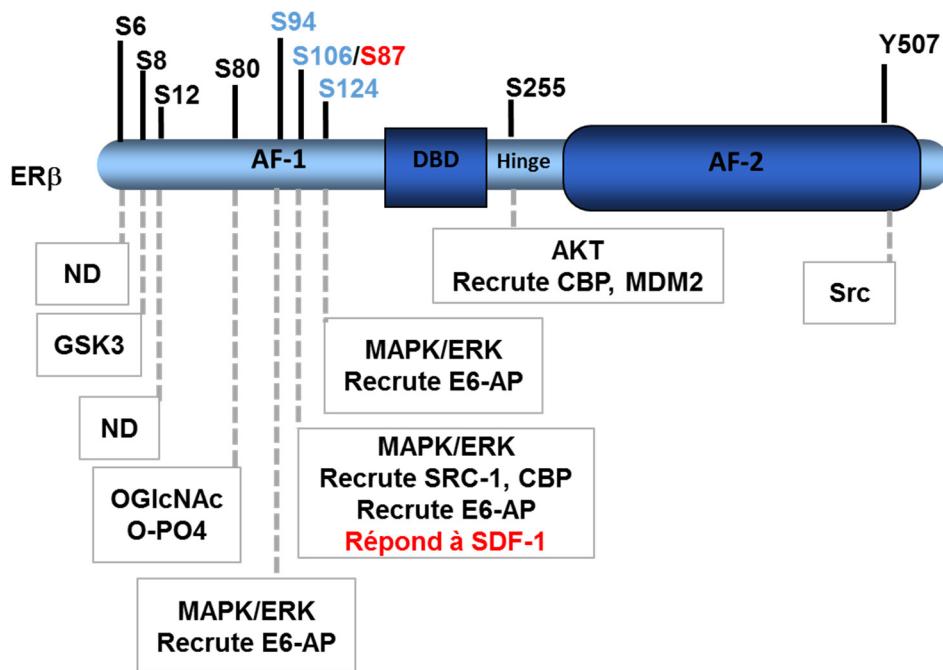


Figure 11. Représentation schématique des sites de phosphorylation sur ER β .
Adaptée de la référence (188).

3.4.4.2 Autres modifications des ERs

La sumoylation consiste en l'ajout d'une molécule *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO) sur des résidus lysines spécifiques de protéines cibles (193). C'est une modification

post-traductionnelle très dynamique qui joue un rôle crucial dans plusieurs processus cellulaires incluant la réPLICATION de l'ADN, la stabilité génomique, le transport nucléaire et la régulation de l'expression des gènes (194). ER α et ER β ne possèdent pas de site accepteur consensus pour SUMO (ψ KXE, small ubiquitin-related modifier) comme c'est le cas des autres récepteurs stéroïdiens (195). La sumoylation d'ER α augmente son activité transcriptionnelle et l'inhibition de cette MPT affecte la liaison d'ER α à l'ADN (196). La sumoylation d'ER β était jusqu'à tout récemment inconnue. Notre laboratoire a démontré qu'ER β est une nouvelle cible de SUMO-1. Cette modification se produit en réponse à l'estrogène, sur la lysine 4 et est amplifiée par la phosphorylation d'une serine adjacente par GSK-3 β . Contrairement à ER α , la sumoylation à un effet répressif sur ER β et inhibe son activité transcriptionnelle et la réponse à l'estrogène de ses gènes cibles (197).

L'ubiquitination (connue aussi sous le nom d'ubiquitylation ou ubiquitylation) est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'attachement covalente d'une protéine, l'ubiquidine (Ubi), sur une ou plusieurs lysines acceptrices présentes sur la protéine cible (198). Sa fonction principale est de marquer sélectivement les protéines pour les diriger vers la dégradation par le protéasome (199). ER α est une cible de l'ubiquitination et plusieurs ubiquitines ligases ont été impliquées dans la régulation de la stabilité d'ER α . L'ubiquitination d'ER α est aussi responsable de sa dissociation du promoteur après chaque cycle de transcription (200). Comme pour ER α , l'activation hormonale maximale d'ER β est aussi dépendante de l'action du protéasome puisque son inhibition par le MG132 réprime l'activité transcriptionnelle E2-dépendante d'ER β (201).

3.5 Rôles biologiques des ERs

3.5.1 Distribution tissulaire

Les études d'immunohistochimie, de Northern blot, d'hybridation in situ et de q-RT-PCR ont permis d'identifier ER α et ER β dans la plupart des types cellulaires dans le corps : épithélium, endothélium, stroma, muscle lisse et squelettique, les os et le cartilage, les cellules hématopoïétiques, les neurones et les cellules gliales. Dans certains organes, les deux isoformes sont exprimés à des niveaux similaires et dans d'autres cas, l'un est prédominant sur l'autre. Parfois, on les retrouve dans différents types de cellules au sein d'un même organe. ER α est majoritairement exprimé dans l'utérus, la prostate (stroma), les ovaires (thèque), les testicules (cellules de Leydig), les os, le sein, le foie, les reins, les tissus adipeux, le cœur, la vessie, le thymus et dans certaines régions du cerveau. Quant à ER β , on le retrouve principalement dans les ovaires (granulosa), les poumons, l'épididyme, la prostate (épithélium), le colon, la moelle osseuse, les glandes salivaires, le cerveau, l'endothélium vasculaire, la vessie, la rate, l'hypothalamus et le thymus (202-204). La grande distribution des récepteurs des estrogènes au niveau de ces différents organes laisse présager d'importants rôles dans de nombreux processus biologiques.

3.5.2 Études de souris « knock-out » : Rôle des ERs dans l'appareil reproducteur

Afin d'évaluer le rôle des ERs dans l'organisme, des souris déficientes (Knock-Out, KO) pour ER α (α ERKO) ou ER β (β ERKO) ont été générées (205, 206). Ces études ont révélé que d'une part l'invalidation des ERs n'est pas létale et ne cause pas d'anomalies phénotypiques

externes. D'autre part, ER α et ER β semblent avoir des fonctions biologiques distinctes et non redondantes. Les souris α ERKO mâles et femelles sont infertiles (207). Chez les femelles, on peut noter en plus, une absence d'ovulation, une hypoplasie de l'utérus et des tissus mammaires peu développés, ce qui démontre le rôle fondamental d'ER α dans la reproduction et le développement des caractères sexuels (208, 209). Les souris β ERKO sont caractérisées par une fonction ovarienne diminuée induisant une fertilité réduite chez la femelle, mais normale chez le mâle, le développement et la lactation des glandes mammaires sont aussi normaux, de même que l'utérus, ce qui indique qu'ER β n'est pas requis pour le développement des caractères sexuels, mais plutôt pour une ovulation optimale (210, 211). Des souris doubles déficientes pour ER α et ER β ($\alpha\beta$ ERKO) furent également générées, elles sont viables, mais infertiles chez les deux sexes comme les souris α ERKO. Elles présentent un développement des caractères reproducteurs normal chez le mâle, mais déficient chez la femelle comme les souris α ERKO, et un phénotype ovarien qui ne ressemble ni au phénotype observé chez les souris α ERKO ni chez les souris β ERKO, à savoir une transdifférenciation ovarienne vers des structures ressemblant aux tubules séminifères des testicules, ce qui suggère une redifférenciation (212). Les mâles quant à eux présentent une diminution du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité ainsi qu'une perte des comportements sexuels (212, 213).

3.6 Les ERs et le cancer

À l'inverse de leurs rôles importants dans le développement et la différenciation des tissus reproducteurs, en plus des rôles protecteurs contre l'ostéoporose ou les maladies neurodégénératives et cardio-vasculaires, les ERs sont impliqués dans l'initiation et le

développement de certains cancers, tels que le cancer du sein, de l'endomètre, de l'ovaire ou encore de la prostate (12, 214).

3.6.1 Rôles d'ER α

ER α est un marqueur pronostique dans le cancer du sein, les résultats obtenus à partir de lignées cellulaires ou de modèles animaux ont révélé qu'ER α est impliqué dans le développement des cancers du sein ER (+). ER α peut exercer son effet tumoral principalement en régulant l'expression de gènes cibles. Certains d'entre eux, sont d'importants régulateurs du cycle cellulaire comme les kinases cycline-dépendantes et cycline D1 (215-217), stimulent la prolifération tels que c-Myc (218) et XBP1 (X-Box Binding Protein 1) (219), la survie cellulaire : Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (220), la formation de métastases : SDF-1 (192), l'invasion : LRH1 (Liver receptor homolog 1) (221) et l'angiogenèse : VEGF (222). Le résultat étant une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et une croissance cellulaire accrue, augmentation des divisions cellulaires, de la synthèse de l'ADN et donc un risque élevé d'erreurs et de mutations lors de la réPLICATION (223) (Figure 10). En absence de ligand, la stimulation des cellules avec l'EGF ou bien la surexpression de l'EGFR membre de la famille ERBB2 augmente l'activité transcriptionnelle d'ER α via la phosphorylation par les MAPK et PI3K et induit ainsi la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (224, 225). Un autre mécanisme serait dû aux métabolites de l'estrogène qui auraient un effet génotoxique direct en induisant des dommages à l'ADN, des mutations et transformations cellulaires (12, 13, 226).

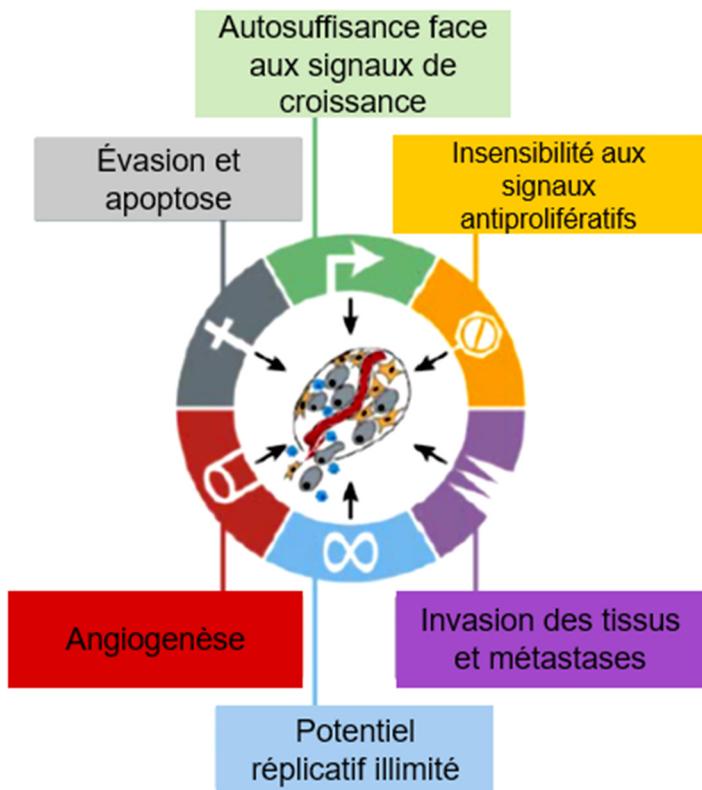


Figure 12. Processus cellulaires impliqués dans la tumorigénèse. Adaptée de la référence (227).

3.6.2 Rôle d'ER β

ER β a été identifié 10 ans après ER α , son implication dans le cancer du sein est donc moins bien établie. Les différences phénotypiques entre les modèles de souris β ERKO qui ont été développés dans divers laboratoires ont donné lieu à une controverse sur le rôle exact d'ER β dans la biologie du cancer du sein. En effet, une étude a rapporté que les tissus les plus affectés sont l'ovaire, l'utérus et les reins alors que les effets sur la glande mammaire sont très minimes (210). Un autre groupe de chercheurs a montré que les souris déficientes pour ER β exhibent une diminution de la différenciation, une augmentation de la prolifération au niveau des alvéoles en

lactation et un développement de kystes dans les seins (228-231), phénotypes n'ayant pas été observés chez les souris développés par d'autres groupes de recherche (232, 233). Cependant, la plupart des études *in vitro* pencheraient plutôt pour un rôle de suppresseur de tumeurs. Ainsi, le tissu mammaire normal exprime un niveau plus élevé d'ER β que d'ER α , et à mesure que le tissu devient tumorigénique, les niveaux de l'ARNm d'ER α augmentent et ceux d'ER β diminuent, suggérant que la perte d'expression d'ER β pourrait contribuer au développement du cancer du sein (234, 235). De ce fait, l'équilibre entre ER α et ER β influencerait grandement le développement des tumeurs. ER β agirait en fait comme un répresseur de l'activité transcriptionnelle d'ER α dans le cancer du sein (214, 236-238). En accord avec un effet antiprolifératif, l'activation d'ER β favorise l'apoptose, supprime la transformation maligne, et inhibe la croissance des cellules tumorales mammaires (191). La surexpression d'ER β dans les cellules cancéreuses mammaires ER α (+), diminue la prolifération cellulaire en réponse à E2 et prévient aussi l'apparition et le développement du cancer du sein dans un modèle murin de xénogreffe (239). Des groupes ont démontré que ER β inhibe la croissance cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et en inhibant l'expression de cycline A, D1, et E, c-Myc et en augmentant l'expression de p53 et p21 (238, 240). Notre laboratoire a démontré que le traitement des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 avec le facteur de croissance héréguline- β 1 induit une diminution de l'expression d'ER β et favorise la prolifération des cellules MCF-7 en réponse à héréguline- β 1, ce qui suggère encore une fois que le ratio ER α /ER β affecte la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (191).

3.7 Approches thérapeutiques pour antagoniser les ERs

Le traitement des cancers du sein repose principalement sur l’ablation des tumeurs. De plus, suivant les cas, des traitements adjuvants sont administrés pour réduire la taille des tumeurs, préalablement à la chirurgie, ou bien après cette dernière, afin de réduire le risque de récidive. Les traitements adjuvants actuels comprennent la chimiothérapie, la radiothérapie et l’hormonothérapie. Dans chaque cas, les bénéfices sont mis en balance avec le risque de complications car ces thérapies ont des effets secondaires forts à court et à long terme. Après que le rôle des estrogènes dans la genèse et la prolifération tumorale dans le cancer du sein notamment fut bien établi, l’idée d’utiliser des anti-estrogènes s’est imposée d’elle-même. Ceci peut se faire en bloquant l’interaction de l’estrogène avec son récepteur par des agonistes partiels, ou bien c’est le récepteur lui-même qui est ciblé par des antagonistes purs, ou encore en bloquant carrément la production d’estrogènes par ovariectomie ou par l’inhibition de la conversion du précurseur de l’estrogène pas des inhibiteurs d’aromatases.

3.7.1 L’hormonothérapie

2/3 des tumeurs mammaires expriment le récepteur des estrogènes ER α . La croissance et la prolifération de ces tumeurs ER α (+) dépendent alors des estrogènes. Les traitements hormonaux ont pour but de bloquer cette prolifération cellulaire estrogène-dépendante en : (i) diminuant le taux d’estrogène circulant (par ovariectomie ou avec des anti-aromatases) ou en (ii) inhibant l’activité d’ER α (avec les anti-estrogènes, figure 11). L’hormonothérapie occupe la première place dans les traitements adjuvants de la chirurgie, mais aussi dans le traitement

palliatif du cancer du sein métastatique. Elle est également utilisée dans la prévention du cancer du sein chez les femmes à haut risque.

3.7.1.1 Anti-estrogènes partiels

Plus connus sous le nom de SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulators), car pouvant à la fois agir en antagonistes des ERs au niveau des tumeurs mammaires tout en mimant le rôle des estrogènes dans d'autres tissus où les ERs ont des rôles bénéfiques. Le premier à avoir été développé est le tamoxifène (ICI 46 474 ; Nolvadex), c'est l'agent chimiothérapeutique le plus couramment utilisé dans le traitement du cancer du sein. En tant que traitement adjuvant, le tamoxifène améliore la survie globale, et contribue significativement à la réduction de la mortalité due au cancer du sein. Administré sous forme de citrate de tamoxifène, il est converti dans le foie principalement en 4 -hydroxy-tamoxifène (OHT) qui a une forte affinité pour ER α . Étant un agoniste partiel de l'estrogène, il présente des effets bénéfiques dans le maintien de la densité osseuse, mais augmente le risque des accidents cardio-vasculaires, en plus de stimuler la croissance tumorale au niveau de l'utérus (241). Ceci a mener au développement d'une nouvelle génération d'anti-estrogènes, le raloxifène qui est un benzothiophène non stéroïde avec une structure tridimensionnelle similaire à celle du tamoxifène (242, 243). Initialement développé pour traiter l'ostéoporose (244, 245) et ayant un rôle protecteur contre la maladie d'Alzheimer (246), il possède les mêmes effets protecteurs que le tamoxifène au niveau des os, mais contrairement à ce dernier, il agit également comme antagoniste au niveau de l'utérus (247). Le tamoxifène et le raloxifène compétitionnent avec l'estrogène pour la liaison au LBD au niveau des ERs, et bloquent de ce fait la liaison de l'estrogène (71). Les ERs sont toujours capables de se dimériser, cependant la présence de l'OHT va affecter le positionnement de l'hélice 12, de manière à favoriser le recrutement des corépresseurs transcriptionnels à la place

de coactivateurs, empêchant ainsi l'activation du domaine AF-2 (248-250). Le niveau d'expression des coactivateurs et des corépresseurs dans la cellule aura donc un impact important sur la sensibilité des ERs à l'action antagoniste des SERMs (251, 252). Par exemple, le tamoxifène agit comme agoniste dans les cellules de l'endomètre où SRC1 est fortement exprimé alors qu'il a un effet antagoniste dans les lignées mammaires qui expriment peu de SRC1 (150, 253). De plus, tant que le tamoxifène peut agir comme agoniste ou antagoniste pour ER α sur un ERE, il agira exclusivement comme antagoniste pour ER β , en raison de leur AF-1 différent (254). Alors que sur des gènes cibles régulés via des sites Sp-1 et AP-1, où l'estrogène est un agoniste pour ER α et un antagoniste pour ER β , le tamoxifène aura le même effet agoniste sur les deux récepteurs (96, 255, 256). Le raloxifène est actuellement testé en essai clinique, mais ne semble pas démontrer des effets supérieurs au tamoxifène ni permettre le traitement des tumeurs qui y sont résistantes.

En effet, malgré l'effet bénéfique évident du tamoxifène, son utilisation est limitée par la survenue du phénomène de résistance acquise avec le temps (257, 258). Par exemple, les cellules cancéreuses mammaires ER (+) MCF-7 maintenues sous un traitement prolongé au tamoxifène puis implantées dans des souris athymiques, prolifèrent de manière tamoxifène-dépendante (259, 260). Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène et la réponse se trouve en partie dans : (i) le récepteur lui-même, à savoir qu'il peut subir une perte d'expression. Étant donné que les effets du tamoxifène sont principalement médiés à travers ER α , le degré d'expression de ce dernier est un prédicteur de la réponse au tamoxifène. Cette perte d'expression d'ER α a été observée chez 17 % des patientes ayant des tumeurs ER (+) au début du traitement et qui sont devenues ER (-) avec le développement de la résistance (261). (ii) Des mutations entraînant une perte de fonction/hypersensibilité d'ER α sans pour autant

affecter son expression. Une mutation substituant l'aspartate en tyrosine à la position 351 altère l'effet antagoniste du tamoxifène et le change en agoniste. De telles mutations pourraient se produire dans les tumeurs et être responsables en partie de cette résistance au tamoxifène (262). La mutation de la lysine 303 en asparagine a d'ailleurs été observée dans des lésions prémalignes, et augmente la sensibilité d'ER α à l'estrogène et le recrutement de coactivateurs même en présence d'une faible concentration d'estrogène (263).

Cependant, comme la plupart des tumeurs expriment un ER α fonctionnel, les pertes d'expression ne sont observées que chez 15-20 % des cancers du sein et moins de 1 % des tumeurs ER (+) ont des mutations d'ER α , ce qui n'est pas suffisant pour expliquer cette résistance. Le problème serait plutôt en grande partie dû au : (iii) mécanisme d'action complexe des ERs. En effet, d'une part ER α peut être activé indépendamment de l'estrogène via la phosphorylation induite par la signalisation des facteurs de croissance via la voie des MAPKs, la voie PI3-K/AKT. D'autre part, une altération de l'expression des cofacteurs pourrait aussi être impliquée. Sachant que l'effet antagoniste du tamoxifène nécessite le recrutement de corépresseurs sur les ERs, un déséquilibre entre l'expression des coactivateurs et des corépresseurs pourrait affecter l'effet antagoniste du tamoxifène (264, 265). Une augmentation de l'expression des coactivateurs SRC-1 et SRC-3 a été retrouvée dans le cancer du sein et de l'ovaire (266-268). Inversement, une diminution des corépresseurs NCoR et SMRT est observée dans le cancer du sein et corrèle avec la résistance au tamoxifène (56, 75).

L'estrogène peut aussi initier la tumorigenèse indépendamment d'ER α via les métabolites génotoxiques de l'estrogène, de ce fait, bloquer le récepteur avec un antagoniste ne servirait à rien. Issus du métabolisme oxydatif de l'estrogène par les cytochromes p450, ces métabolites, en particulier les catéchols et leurs dérivés quinoliques forment des adduits à l'ADN qui à leur

tour provoquent la dépurination de l'ADN, ce qui cause des mutations. La formation des quinones peut aussi conduire à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). La production excessive de tous ces dérives peut avoir des conséquences délétères pour les cellules car ces molécules endommagent l'ADN (12, 13). Pour contrer cette résistance, d'autres traitements alternatifs ont été développés, soit les anti-estrogènes purs qui dégradent ER α ou bien bloquer carrément la production de l'estrogène par les inhibiteurs des aromatases.

3.7.1.2 Anti-estrogènes totaux

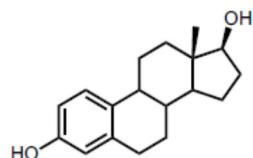
Les anti-estrogènes totaux appelés aussi SERDs pour selective estrogen receptor downregulator, ont été conçus à partir de la structure du 17 β -estradiol comme point de départ, afin de bloquer complètement ER α . L'ICI 164.384 (Imperial Chemical Industrie) est le premier anti-estrogène total à avoir été développé. Ce composé ne présente aucun effet agoniste et inhibe les effets agonistes de l'estradiol aussi bien dans le sein que dans l'utérus (269). D'autres anti-estrogènes totaux ont par la suite été développés dans le but d'augmenter la biodisponibilité et l'affinité de l'ICI 164.384 : RU39416, RU48668, EM 139, EM800 et ICI 182, 780 (270, 271).

L'ICI 182,780, également connu sous le nom de Fulvestran ou Falsodex, ne fait pas que se lier aux ERs pour inhiber leur liaison avec E2 comme c'est le cas des anti-estrogènes partiels, mais il entraîne aussi la dégradation d'ER α , mais pas d'ER β . En effet, l'ICI empêche la dimérisation du récepteur, sa translocation et bloque son recrutement au niveau des EREs. Le complexe ER α -ICI est alors instable et inactif, car les domaines AF-1 et AF-2 sont désactivés, il est rapidement polyubiquitiné induisant sa dégradation par le protéasome (272, 273). Étant dépourvu d'activité agoniste, son utilisation pourrait être combinée avec des médicaments contre l'ostéoporose (274-276). Le blocage d'ER α et la diminution de ses niveaux cellulaires

par l'ICI, inhibent la signalisation par les estrogènes, en bloquant les voies ERE-dépendante et indépendante, mais aussi non-génomiques des estrogènes (127). L'ICI inhibe la croissance des cellules cancéreuses mammaires ER α (+) MCF-7 plus efficacement que le tamoxifène (277). De plus, il a démontré des taux de bénéfice clinique de 69 % chez les femmes ménopausées ayant une tumeur résistante au tamoxifène et les essais cliniques ont montré qu'il est aussi efficace que les inhibiteurs des aromatases (278).

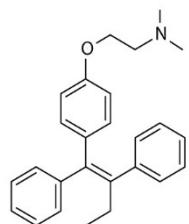
Estrogène

17 β -Estradiol

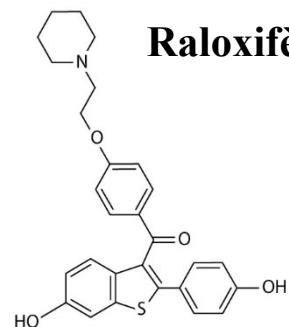


Anti-estrogènes partiels

Tamoxifène

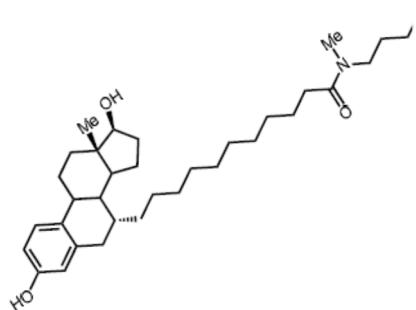


Raloxifène



Anti-estrogènes totaux

ICI 164.384



ICI 182.780

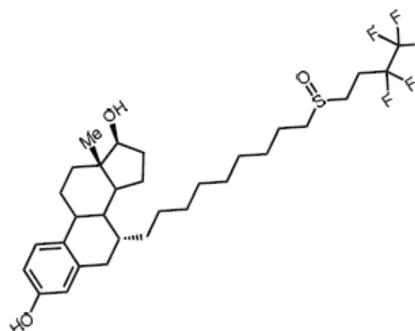


Figure 13. Structure chimique du 17 β -estradiol et de quatre anti-estrogènes.
Adaptée de la référence (279).

3.7.2 Anticorps monoclonaux

Étant donné l’implication des voies de signalisation intracellulaire dans la progression E2-indépendante des cancers du sein et aussi dans le développement de la résistance aux traitements, des approches thérapeutiques ont été élaborées pour antagoniser la signalisation de ces voies. L’herceptin (trastuzumab) et le Perjeta (pertuzumab) sont des anticorps monoclonaux permettant de bloquer le récepteur Her2 impliqué dans la prolifération estrogène-indépendante des cellules cancéreuses mammaires. L’herceptin est disponible sur le marché canadien depuis 1999 et a permis une meilleure prise en charge des patientes atteintes des cancers du sein HER2 (+). Ces cancers représentent 20 % des cancers du sein et étaient associés à un mauvais pronostic. Administré en thérapie adjuvante pendant un an, ces anticorps permettent d’augmenter grandement le temps de survie des patientes en plus de diminuer de moitié le risque de rechute (280). Il existe également un anticorps monoclinal, géfitinib dirigé contre un autre récepteur à activité tyrosine kinase, le récepteur EGFR.

Des inhibiteurs de la voie des chimiokines SDF-1/CXCR4 tel que les bicyclams (analogues du SDF-1) ont aussi été développé et semblent prometteurs puisque les études précliniques *in vitro* ou *in vivo* sur les souris démontrent qu’ils ont des effets anti-métastatiques (281).

3.7.3 Inhibiteurs de l’aromatase

L’incidence du cancer du sein est plus élevée chez les femmes après la ménopause alors que les ovaires ont cessé de fonctionner et de produire l’estrogène. De plus, chez ces femmes-là, les niveaux d’estrogène sont 10 à 50 fois plus élevés dans le tissu mammaire que dans le sang (12). On sait aussi que les tumeurs expriment un niveau élevé d’aromatases leur permettant de synthétiser l’estrogène localement, le résultat étant un niveau plus élevé d’estrogène dans la

tumeur elle-même que dans le tissu sain. De plus, l'inhibition des aromatases par siRNA diminue la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (13). Ces observations démontrent bien que l'estrogène peut être produit *de novo* dans différents organes par les aromatase, enzymes responsables de la biosynthèse d'estrogène à partir des androgènes, et favorise ainsi le développement de tumeurs (282, 283). Ceci a mené au développement d'inhibiteurs de l'aromatase tels que l'anastrozole, le letrozole ou l'exemestane. Ils sont très efficaces pour inhiber la synthèse des estrogènes d'origine périphérique, par contre, ils ne bloquent pas la synthèse des estrogènes d'origine ovarienne, et ne peuvent donc être utilisés que chez les patientes ménopausées (284). Les essais cliniques ont aussi démontré que ces inhibiteurs d'aromatases sont plus efficaces que le tamoxifène chez les femmes ménopausées, car ils permettent une réduction du risque de rechute, mais n'augmentent pas la survie des patientes (285, 286). Ils ont également fait preuve de leur supériorité sur le tamoxifène pour traiter les cancers du sein métastatiques (287). À l'inverse, l'ovariectomie permet de supprimer la production des estrogènes par les ovaires chez les femmes non ménopausées, mais ne permet pas d'inhiber leur production par les tissus périphériques.

3.7.4 Composés interférant avec la liaison des ERs à l'ADN ou aux cofacteurs

Au lieu de cibler la liaison de l'estrogène aux ERs avec les SERMs, une nouvelle approche consiste à inhiber la liaison d'ER α à l'ADN grâce à deux composés récemment identifiés, le TPBM (theophylline, 8-[(benzylthiol)methyl]) et DIBA (dithiobisbenzamide). Tous les deux inhibent l'expression des gènes cibles d'ER α et la croissance E2-dépendante des cellules cancéreuses mammaires (288, 289). DIBA a la particularité d'interagir avec le motif à doigt de zinc du DBD d'ER α , empêchant de ce fait l'interaction de ce dernier aux EREs et permet de

restaurer l'effet antagoniste du tamoxifène dans des cellules du cancer du sein qui y sont résistantes (290).

Suite à la liaison du ligand, le recrutement de coactivateurs est une autre étape cruciale menant à l'activation des gènes cibles des ERs. Une autre alternative consiste à inhiber l'interaction des ERs avec leurs coactivateurs. Des peptides contenant les motifs LXXLL caractéristiques des coactivateurs ont été développés à cet effet (291, 292) et semblent avoir un potentiel thérapeutique prometteur. Ils interfèrent notamment avec la liaison des ERs avec les coactivateurs SRC-1 ou SRC-3 (293, 294).

4 Les hyaluronidases

4.1 Classification

Les hyaluronidases (Hyals) sont une famille d'enzymes largement distribuées au sein du règne animal. Elles ont été initialement identifiées dans des extraits de testicules de mammifères qui contenaient des facteurs facilitant la diffusion de vaccins antiviraux injectés par voie sous-cutanée. Le terme hyaluronidases leur a ensuite été attribué par Karl Meyer en 1952 (295) pour désigner ces facteurs comme étant des enzymes qui dégradent le hyaluronan, appelé aussi acide hyaluronique (HA). Les analyses biochimiques réalisées sur ces enzymes lui ont permis de les classifier en trois groupes distincts en fonction de leurs différents mécanismes d'action et des produits générés. Le premier groupe comprend les hyaluronidases mammifères (E.C. 3.2.1.35), ce sont des endo- β -N-acetyl-hexosaminidases qui clivent les liens β 1,4 du HA et dans une moindre mesure les sulfate de chondroitines (CS) pour générer principalement des

oligosaccharides (tétrasaccharides et hexasaccharides). Les CS ressemblent au HA, la seule différence entre les deux étant que le N-acetylglucosamine du HA est remplacé par un N-acetylgalactosamine dans les CS. Le deuxième groupe est représenté par les hyaluronate-3-glycanohydrolases (E.C. 3.2.1.36), ce sont des endo- β -glucuronidases qui clivent les liens glucuronate du HA pour générer des tétrasaccharides et des hexasaccharides comme produits finaux, elles sont retrouvées dans la salive de la sangsue et de l'ankylostome et autres parasites. Enfin le troisième groupe fait référence aux hyaluronidases de type bactérien, ce sont des endo- β -N-acetylhexoaminidases qui réduisent le HA et les CS en disaccharides (296, 297).

4.2 Organisation génomique

Le génome humain possède six séquences paralogues de types hyaluronidases, connues aussi sous le nom de gènes hyaluronoglucosaminidases (Figure 12). Ces 6 gènes partagent environ 40 % d'identité entre eux, mais ont une distribution tissulaire unique pour chaque gène. Les hyaluronidases humaines sont organisées en groupe de trois sur deux chromosomes distincts, sur le chromosome 3p21.3 sont retrouvés *HYAL-1*, *HYAL-2* et *HYAL-3*, leur organisation génomique est similaire avec quelques différences, par exemple *HYAL-1* possède un intron supplémentaire dans l'exon 1 qui n'est pas présent dans les deux autres séquences *HYAL-2* et *HYAL-3* (Figure 13). Sur le chromosome 7q31.3, on retrouve *HYAL-4*, *PH-20/SPAMI* et *HYALP1* qui est un pseudogène. Parallèlement chez la souris, il y a sept gènes paralogues de type hyaluronidase regroupés sur deux chromosomes. Comme chez l'humain, on retrouve *Hyal-1*, *Hyal-2* et *Hyal-3* sur le chromosome 9F1, tandis que *Hyal-4*, *Ph20/Spam1* et *HyalP1* sont localisés sur le chromosome 6A2 où l'on retrouve le 7^e gène *Hyal-5* qui n'est pas

présent chez l'humain (Figure 12). La séquence est bien conservée entre les hyaluronidases orthologues humaines et de souris avec un degré d'homologie plus élevé que celui observé entre les six gènes paralogues des hyaluronidases humaines (298, 299).

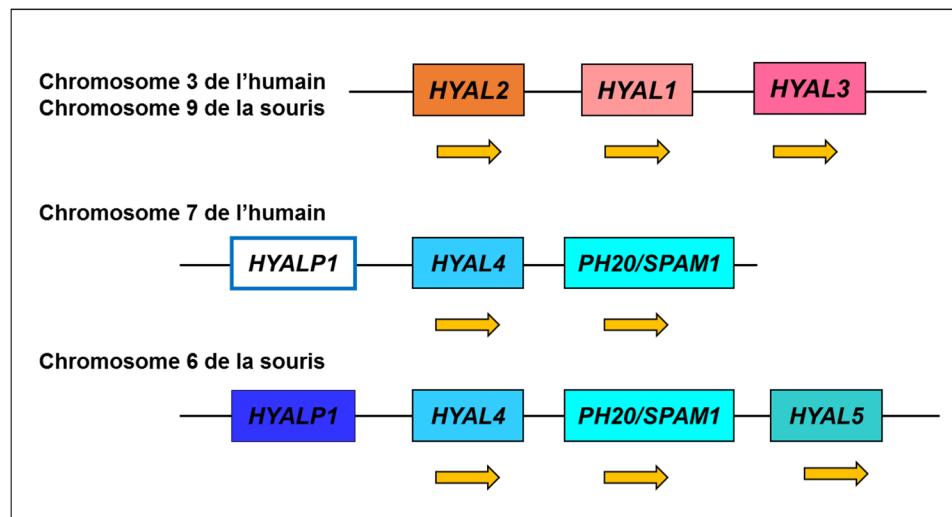


Figure 14. Arrangement chromosomique des différents gènes hyaluronidases chez l'humain et la souris.

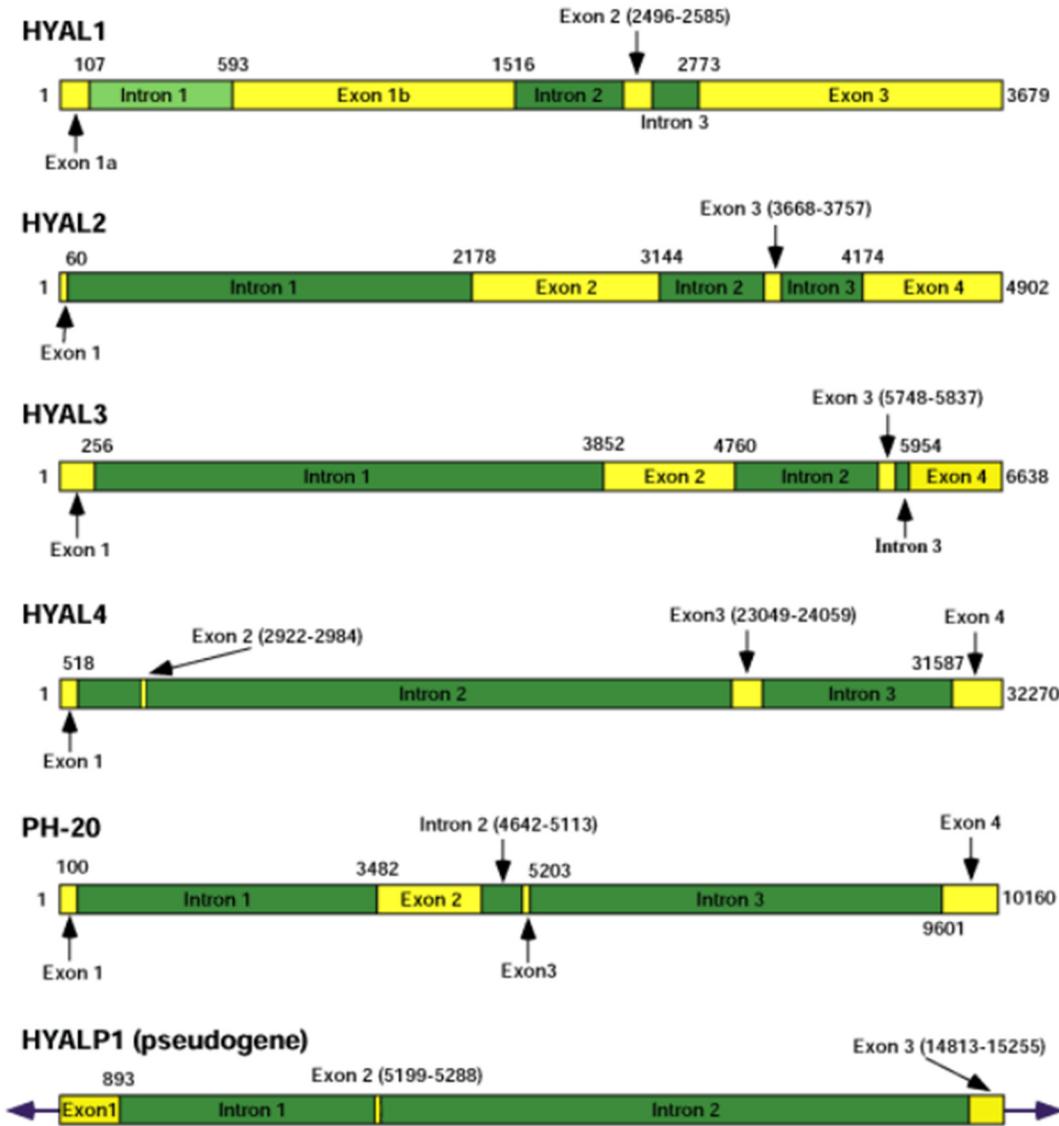


Figure 15. Les gènes codant les hyaluronidases humaines.

Les exons sont indiqués par les rectangles jaunes et les introns par des rectangles verts.
Adaptée de la référence (299).

4.3 Structures, distribution et rôles physiologiques des hyaluronidases mammifères

Les hyaluronidases mammifères ont toutes un peptide signal (SP) à l'extrémité N-terminal, suivi d'un domaine catalytique pour hydrolyser le HA, et un domaine à l'extrémité C-terminal. C'est ce domaine C-terminal qui est variable, il peut contenir soit des séquences EGF-like pour HYAL-1 et HYAL-2 ou bien un domaine de liaison à la zone pellucide ZPB (Zona pellucida binding) pour PH20 et Hyal-5. HYAL-2, PH20 possède en plus un domaine d'ancrage GPI (Glycosylphosphatidil-inositol) qui permet la liaison de l'enzyme à la surface externe de la membrane plasmique (Figure 14) (300).

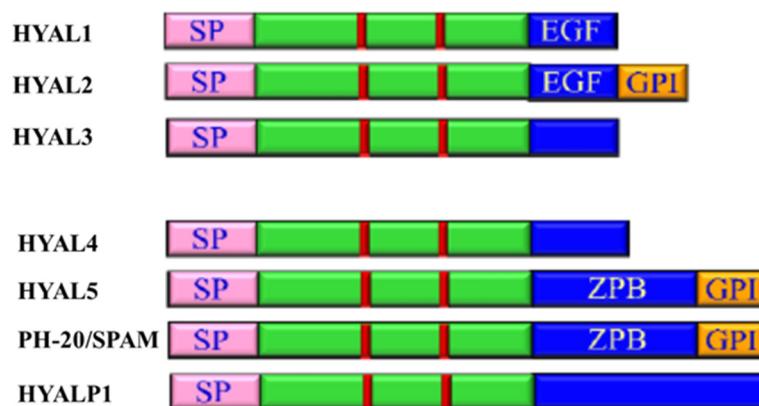


Figure 16. Les différents domaines protéiques des hyaluronidases.

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

Les hyaluronidases ont une expression tissulaire spécifique reliée à leur localisation au niveau chromosomal. Ainsi, HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3 situées sur le même chromosome

sont exprimées de façon ubiquitaire. HYAL-1 et HYAL-2 sont les principales hyaluronidases somatiques et sont connues tant pour leurs rôles physiologiques que pathologiques, par exemple dans la cicatrisation des blessures, l'inflammation et l'ostéoarthrite. Tant dis que les 3-4 autres hyaluronidases sont regroupées sur le même chromosome et sont principalement retrouvées au niveau du système reproducteur mâle.

HYAL-1 est la première hyaluronidase à avoir été purifiée à partir du plasma humain (299), elle a ensuite été séquencée, clonée et exprimée en 1997 par Frost et *al* (301). Cette une glycoprotéine de 57 kDa, composée d'une seule chaîne polypeptidique de 49 kDa (435 aa) avec 8 kDa de modification post-traductionnelle, soit la glycosylation. HYAL-1 partage 40 % d'homologie avec son homologue PH-20 présent au niveau du sperme. L'orthologue de la souris qui fut également cloné la même année, possède 73 % de similitude avec l'enzyme humaine (302, 303). HYAL-1 est active à pH acide et est retrouvée en majorité dans le foie, la rate, le cœur, les reins et la peau. Les urines aussi contiennent une forte activité hyaluronidase, 100 fois plus que la concentration présente dans le plasma (304). En plus de l'isoforme de haut poids moléculaire, une deuxième protéine de 45 kDa a aussi été détectée dans l'urine, ayant la même séquence que HYAL-1, mais plus courte avec 100 acides aminés manquants au niveau C-terminal (302). La structure cristalline de HYAL-1 a révélé deux domaines fonctionnels distincts, un domaine catalytique principal et un domaine EGF-like du côté C-terminal, probablement impliqué dans les interactions protéine-protéine (305). L'implication des hyaluronidases dans la dégradation de l'acide hyaluronique fut confirmée par le fait que les patients souffrant de mucopolysaccharidose IX, une pathologie de stockage lysosomal présentent des lésions articulaires et squelettiques caractérisées par une accumulation de glycosaminoglycanes dans les lysosomes. Cette maladie est associée à une déficience de

l'activité hyaluronidase et une augmentation significative de la concentration du HA sérique (306). Plus tard, deux mutations identifiées sur le gène HYAL-1 ont révélé que c'est la déficience en HYAL-1 qui est à l'origine de la mucopolysaccharidose IX chez ces patients (307, 308). Un modèle de mucopolysaccharidose fut généré chez les souris, elles ont un phénotype similaire à celui observé chez l'humain, mais moins sévère, avec une perte précoce de protéoglycans dans le cartilage des articulations et une accumulation du HA dans les lysosomes typique de l'ostéoarthrite (309). Dans une récente étude où je suis co-auteure, nous avons aussi démontré que HYAL-1 est un important régulateur du développement folliculaire, et que la déficience en HYAL-1 affecte la fertilité chez les souris femelles en altérant la voie de signalisation des follistatines/activines/Smad3 (310).

La deuxième hyaluronidase est HYAL-2, elle est également active à pH optimum acide et est aussi très présente dans de nombreux tissus, on la retrouve ancrée à la membrane plasmique de certaines cellules par des liaisons glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) (311). L'ADN codant HYAL-2 a été isolé et caractérisé à partir de la souris et du *Xenopus laevis*. Comme HYAL-1, HYAL-2 clive l'acide hyaluronique, mais ses produits de dégradation sont de haut poids moléculaire (fragments d'environ 20 kDa), de plus son activité enzymatique est beaucoup plus faible que celle de HYAL-1 et de PH20. Chez l'humain, elle sert aussi de récepteur pour le rétrovirus de Jaagsiekte du mouton (312, 313). Il a aussi été démontré que HYAL-1 et HYAL-2 peuvent agir de concert pour dégrader le HA. Les produits de digestion de HYAL-2 sont dégradés en oligosaccharides de très faibles poids moléculaires par l'action de HYAL-1 (314).

Inversement, HYAL-3 ne semble pas avoir d'activité hyaluronidase puisque les souris qui en sont déficientes ne montrent aucune accumulation de HA (315) et son rôle physiologique n'a toujours pas été entièrement déterminé. HYAL-3 est exprimée dans de nombreux tissus comme

les deux premières hyaluronidases. Elle est notamment présente dans les chondrocytes, les fibroblastes et dans les testicules sans pour autant qu'un rôle précis lui soit attribué (316). L'expression de HYAL-3 et HYAL-2 est régulée positivement par les cytokines inflammatoires comme IL-1 (interleukine-1) et TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), tant dis que HYAL-1 ne l'est pas (317).

Parmi les hyaluronidases mammifères, la hyaluronidase PH20 est la plus étudiée et la mieux caractérisée en raison de son rôle nécessaire pour la fertilisation. C'est la hyaluronidase du système reproducteur mâle localisée sur le chromosome 7q31 chez l'humain et 6A2 chez la souris (318). PH20 est aussi connue sous le nom de SPAM1 (Sperm Adhesion Molecule 1), elle est retrouvée au niveau des spermatozoïdes plus exactement à leurs surfaces et aussi dans l'acrosome liée à la membrane interne acrosomale grâce à son ancrage GPI. PH20 facilite de ce fait la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte en dispersant la couche cumulus qui entoure l'ovocyte par hydrolyse du HA, permettant ainsi la fécondation (319, 320). PH20 est active aussi bien à pH acide qu'à pH neutre, ces activités font intervenir deux domaines différents dans cette protéine (320-322).

Sur le même regroupement de chromosome que PH20, on retrouve aussi HYAL-4 et HYALP1, qui sont également exprimées dans les testicules. Chez l'humain PH20 est la seule hyaluronidase fonctionnelle dans cette région chromosomique puisque HYALP1 est un pseudogène alors que HYAL-4 est une chondroitinase qui dégrade les sulfates de chondroitines. Par contre, chez la souris Hyalp1 code pour une protéine et le 7^e gène, Hyal-5 pour une autre protéine, les deux étant exprimées dans le sperme et ont un rôle similaire à celui de PH20 dans la fécondation (323).

Dans les fibroblastes de la peau chez l’humain, une nouvelle protéine a récemment été identifiée, KIAA1199, elle se lie au HA et induit sa dégradation indépendamment de HYAL-1 et HYAL-2. Le knock-down de KIAA1199 altère la dégradation du HA dans ces fibroblastes (324).

4.4 Les hyaluronidases et le cancer

L’implication des hyaluronidases dans le cancer a été beaucoup étudiée, mais reste néanmoins controversée. Les premières études leur ont d’abord attribué un rôle de suppresseur de tumeurs en raison de leur localisation sur le chromosome 3p21.3 connu pour être une région de gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, cette région du chromosome 3 est sujette à des délétions fréquentes aussi bien dans les carcinomes du poumon, du rein, du cou et du sein (302, 325, 326). Dans le cancer épithelial de l’ovaire, des déséquilibres alléliques ont aussi été observés au niveau des trois gènes hyaluronidases (327), en plus d’une diminution de l’expression de l’ARNm et l’activité de HYAL-1 dans le cancer épithelial de l’ovaire (CÉO) de type sérieux comparativement aux ovaires normaux (328). En accord avec ces observations, l’accumulation extracellulaire du HA est souvent retrouvée dans le stroma tumoral et de dans la matrice péricellulaire de l’ovaire et est associée à un mauvais pronostique (329, 330), ce qui confirme l’hypothèse d’un rôle de gène suppresseur de tumeurs. D’autres études sont par contre en faveur d’un rôle de promoteur de tumeurs. Des niveaux élevés de HYAL-1 ont notamment été observés dans divers cancers, tels que celui du cou, de la tête, du sein et dans les glioblastomes, où HYAL-1 favorise la progression tumorale et corrèle avec le caractère malin de ces cancers (331-333). Cette expression élevée de HYAL-1 est considérée comme un

marqueur pronostique potentiel pour prédire la progression tumorale et les métastases dans le cancer de la vessie (334-337), de la prostate (338), du cou et de la tête (331).

En outre, dans le cancer de la prostate, de la vessie et du sein, il a été démontré que HYAL-1 stimule la progression du cycle cellulaire via la transition G2/M par la surexpression de régulateurs positifs tels que cdc25c, cycline B1 (334, 339, 340). De ce fait, l'inhibition de l'expression de HYAL-1 par RNA interférence induit une diminution de la prolifération et de l'invasion tumorales en induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires de ces mêmes types cancéreux (341), tant que la surexpression de HYAL-1 dans le cancer du sein a entraîné une augmentation de la croissance, la prolifération, l'invasion tumorale et de l'angiogenèse (332, 342).

4.5 L'acide hyaluronique

Le substrat des hyaluronidases est l'acide hyaluronique (HA) ou hyaluronan. C'est un polysaccharide de haut poids moléculaire appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAG). Il est formé par la répétition d'unités dissacharidiques d'acide glucuronique et de N-acétylglycosamine [-D-acide glucuronique- β 1, 3-Nacetyl-D-glucosamine- β 1, 4-] n (Figure 15) (343). Le HA est synthétisé par des enzymes appelées HA synthases (HAS ; EC 2.4.1.) (344).

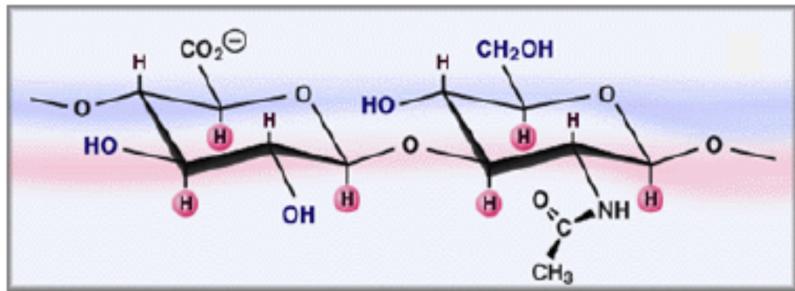


Figure 17. Représentation de la structure du HA. Adaptée de la référence (345).

Le HA est un composant majeur de la matrice extracellulaire (MEC), il est présent dans la plupart des tissus chez les vertébrés. Malgré sa structure relativement simple, le HA est un glycosaminoglycane extraordinairement polyvalent qui reçoit actuellement l'attention d'un grand nombre de domaines de recherche. En effet, différents rôles physiologiques lui sont associés, notamment dans le maintien l'intégrité structurale des tissus et des cellules grâce à ses propriétés hydrodynamiques. En particulier, grâce à sa viscosité et à sa capacité à retenir l'eau, il assure la lubrification, l'hydratation, l'homéostasie et le remodelage des tissus, il sert aussi de filtre permettant le passage des petites molécules (346, 347). Le hyaluronan intervient aussi lors de la cicatrisation des blessures et plus récemment, il est devenu populaire dans le domaine cosmétique pour le comblement des rides (348-350). Cependant, le HA a aussi été impliqué dans le cancer et son rôle a été largement étudié (331, 351). Indirectement, grâce à ses caractéristiques hydrodynamiques uniques, le HA confère une certaine malléabilité et porosité à la MEC la rendant de ce fait permissive à la migration et à l'invasion tumorale. En plus d'avoir un effet direct, en effet, il a été démontré que le HA, via sa liaison avec les récepteurs de surface : le CD44 ou RHAMM (Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility), est un point d'ancrage pour les cellules tumorales favorisant l'invasion tumorale et les métastases (352). Dans le cancer de

l'ovaire notamment, l'adhésion des cellules tumorales à la couche de HA pericellulaire des cellules mésothéliales est une étape déterminante dans la propagation des carcinomes ovariens (353). En outre, la liaison du HA au domaine extracellulaire du CD44 promeut l'association de son domaine intracellulaire avec des protéines du cytosquelette, les ankirines et les rhoGTPases entraînant à leurs tours l'activation de cascades de signalisation impliquées dans la survie, la migration et l'invasion (354, 355).

Bien que ces études aient impliqué le hyaluronan dans la tumorigénèse, de nombreux rapports ont démontré que le métabolisme/dégradation du HA est également essentiel à la progression tumorale. En accord avec ces observations, des concentrations élevées du HA sont retrouvées comme c'est le cas pour HYAL-1 dans différents cancers, de la vessie, du sein, la prostate, le glioblastome, les cancers de la tête et du cou et le colon, et semblent influencer la progression tumorale et les métastases (331, 356-359). Ce sont en fait les petits fragments de HA de faible poids moléculaire générés suite à sa dégradation par la hyaluronidase HYAL-1 qui seraient impliqués dans l'invasion tumorale en stimulant l'angiogenèse (360, 361). D'environ 10 à 15 disaccharides, ces petits fragments de HA favorisent la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de capillaires, en induisant l'expression de facteurs angiogéniques tels que FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) (362). Ces mêmes fragments de HA sont retrouvés dans les urines de patients atteints de cancer de la vessie où ils servent de marqueurs permettant la détection des tumeurs de la vessie de haut grade (335, 337, 363), des cancers de la prostate (356) et dans la salive de patients atteints des cancers de la tête et du cou (331). Il a ainsi été proposé que ce sont les petits fragments de HA qui lient les récepteurs de surface CD44 et RHAMM, pour ensuite activer la voie de signalisation PI3K/AKT, puisque l'inhibition de la génération de

ces petits fragments, suffit à inhiber tous les processus induits par l'activation de PI3K/AKT (Figure 16) (364). L'activation d'AKT induit la croissance et la survie cellulaire, la motilité et l'invasion, favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'activation de NFkB ainsi que l'expression de VEGF. L'activation d'AKT induit également l'expression RHAMM et CD44 créant ainsi une boucle de régulation positive (364).

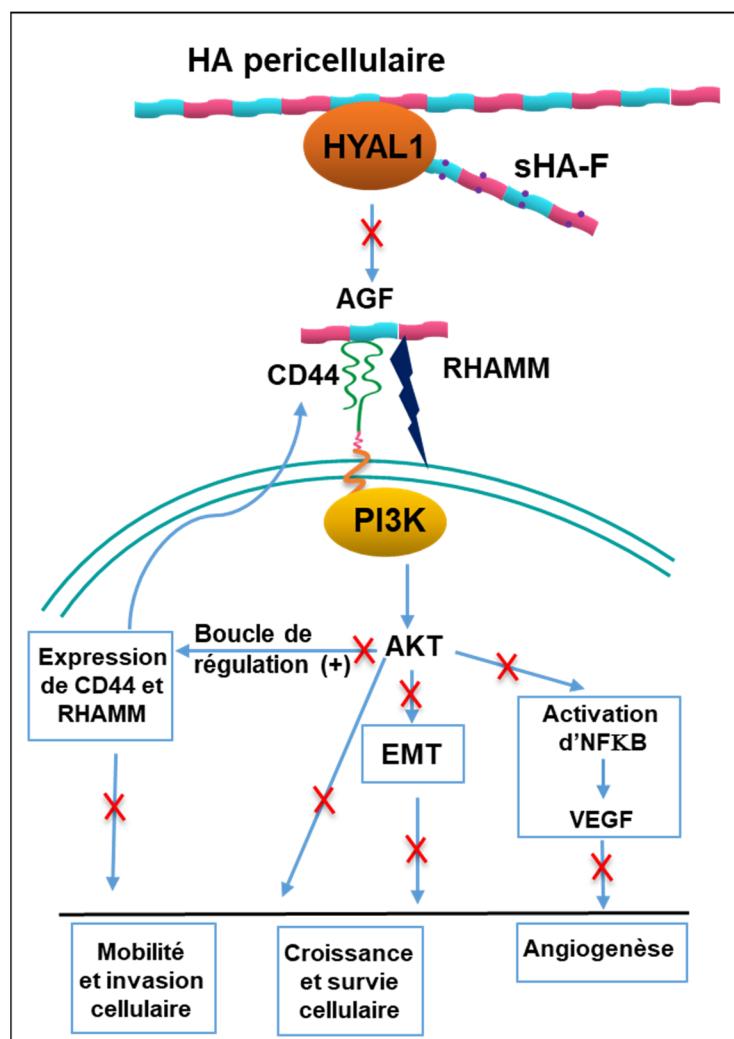


Figure 18. Mécanisme d'action de HYAL-1/HA dans la tumorigenèse.
 sHA-F : fragment d'acide hyaluronique sulfaté. AGF : fragments angiogéniques.
 Adaptée de la référence (364).

5 Le facteur de transcription TAL1

5.1 Découverte du gène *Scl/Tal1*

Le gène *Tal1* a été initialement identifié chez un jeune patient atteint d'une leucémie lymphoblastique aiguë des cellules T (T-ALL). Lorsque les cellules tumorales du patient ont été mises en culture, elles se sont différenciées en lignées myéloïdes et lymphoïdes indiquant que le gène réarrangé était impliqué dans la détermination des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules lymphoblastiques tumorales du patient présentaient une translocation entre les chromosomes 1p32-33 et 14q11 au niveau du locus α du récepteur T (TCR). La région affectée par la translocation a été clonée sur le locus non réarrangé et un nouveau gène, *Scl* pour Stem Cell Leukemia, a été identifié (365, 366). D'autres noms lui ont été attribués par la suite, tels que *Tall* (T-cell acute lymphoblastic leukemia-1) (367) ou bien *TCL-5* (T-cell leukemia-5) (368). En raison de ce réarrangement de la région p32-33 du chromosome 1 qui contient le gène *Tal1*, ce dernier devient surexprimé de façon aberrante dans les T-ALL alors qu'il est normalement inactif durant la lymphopoïèse T normale (369). Différents mécanismes sont à l'origine de l'activation du gène *Tal1* dans les leucémies, le plus connu est la translocation t (1 ; 14), retrouvée chez un quart des patients et qui se produit lors de l'activation des enzymes recombinases impliquées dans les réarrangements du TCR (366). En effet, les séquences d'ADN spécifiques reconnues par les recombinases ressemblent à celles de *Tal1*, ce qui les rend donc potentiellement reconnaissables par les recombinases qui vont induire une cassure au niveau du locus *Scl/Tal1* et la translocation t (1 ; 14) (370). D'autres translocations se produisant sur les chromosomes 3, 5 et 7 ont aussi été décrites (371). Un autre mécanisme par lequel *Tal1* est activé dans les T-ALL est une délétion d'un fragment d'ADN de 90 kb situé entre le gène *sil*

(*scl* interrupting locus) et le gène *Tal1*, ce dernier devient alors sous le contrôle des séquences régulatrices du gène *sil*, ce mécanisme est retrouvé chez un quart des patients (372). Par contre dans d'autres cas de T-ALL, on ne retrouve ni de translocations ni la délétion *sil/Tal1*, ce qui suggère que d'autres mécanismes seraient impliqués dans l'activation de *Tal1* (373).

5.2 Expression de TAL1

L'expression de l'ARNm de TAL1 a été mise en évidence grâce à des analyses de Northern blot, q-PCR et hybridation in situ dans différentes lignées cellulaires et tissus. TAL1 a d'abord été détecté au niveau du foie fœtal, de la moelle osseuse, des lignées cellulaires myéloïdes ainsi que dans les lignées cellulaires T leucémiques. Chez l'homme et la souris adulte, son expression se restreint aux progéniteurs hématopoïétiques immatures et aux lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires (369, 374-376). Plus tard, des expériences d'immunocytochimie ont permis de caractériser l'expression de TAL1 en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine TAL1, mettant en évidence le taux d'expression et la sublocalisation cellulaire de TAL1 (377). L'expression de TAL1 ne se limite cependant pas qu'aux tissus hématopoïétiques, et a aussi été détectée dans d'autres tissus. En premier, dans le système nerveux, notamment au niveau du cerveau murin, dans les neurones post-mitotiques du métencéphale (374, 378). Chez l'humain, TAL1 est présent au niveau du mésencéphale et du rhombencéphale, et ce aussi bien dans le système nerveux central d'un adulte que dans celui d'un embryon en développement (379). TAL1 est aussi exprimé dans le système musculaire et squelettique, notamment dans les mélanocytes, les cellules du cartilage, les cellules osseuses et dans le muscle lisse utérin (380), et enfin dans les cellules endothéliales au niveau des vaisseaux

sanguins de la rate (381). Cette présence de TAL1 dans d'autres tissus porte à croire qu'il pourrait avoir d'autres fonctions dans l'organisme. Il est intéressant aussi de souligner que le patron d'expression de TAL1 a été fortement conservé au cours de l'évolution, puisqu'il est très semblable des poissons téléostéens aux mammifères. De plus, la structure du gène est aussi très homologue à travers ces mêmes espèces, les fonctions physiologiques de TAL1 pourraient aussi avoir été conservées au cours de l'évolution (382, 383).

5.3 Structure de TAL1

Le gène *Tall* est composé de huit exons distribués sur une séquence génomique de 16Kb (384). Il permet la production d'un facteur de transcription TAL1 appartenant à la famille des protéines à domaine « basique hélice boucle hélice » (bHLH) de classe II (367, 385). Le domaine HLH est composé de deux hélices (a) amphipathiques séparées par une boucle, il permet l'hétérodimérisation de TAL1 avec d'autres protéines bHLH de la classe I dont l'expression est ubiquitaire, appelées les protéines E, cette classe comprend : les protéines E2A (E12, E47), E2-2 et HEB (386). Ce domaine permet aussi l'association de TAL1 avec d'autres facteurs de transcription hématopoïétiques tels que GATA-1/3, LMO2 (LIM domain only 2) et LDB1 (LIM domain binding protein 1) (387, 388). Le domaine basic (b) permet la liaison de la protéine à l'ADN de façon séquence-spécifique au niveau d'une boite-E (E-box) de séquence consensus AACAGATGGT définie *in vitro*. La moitié de la séquence AACAG sert à la reconnaissance par les protéines bHLH de classe I et l'autre moitié ATGGT par TAL1 (389, 390). La protéine TAL1 contient également un domaine riche en proline en N-terminal, qui représente un domaine de transactivation transcriptionnelle, et un domaine riche en glycine en C-terminal

et dont l'impact sur la structure de TAL1 n'a pas encore été élucidé (370, 391). La protéine TAL1 est une phosphoprotéine, TAL1 peut ainsi être phosphorylé par la MAP kinase Erk1 sur un résidu sérine en position S122, cette modification augmente l'activité du domaine de transactivation riche en proline (392-394). TAL1 est également phosphorylé sur son résidu sérine S172 par PKA, cette modification n'a pas d'effet sur l'hétérodimérisation avec les protéines E, mais peut affecter la liaison de TAL1 à l'ADN au niveau de la boîte E et ce dépendamment du gène cible (394, 395). Par exemple, la phosphorylation de TAL1 sur la sérine S172 n'altère pas sa capacité à se lier au promoteur du gène P4.2 (396). Enfin, la phosphorylation de TAL1 sur un résidu thréonine 90, Thr90 par AKT, a pour effet d'inhiber l'effet répresseur de TAL1 observé sur le promoteur du gène P4.2 (397).

Le gène *Tall* code en fait pour deux phosphoprotéines (377) (Figure 17). La première est un isoforme pleine longueur de 37- 42 kD (1-331 aa) appelé aussi pp42, la deuxième est une forme tronquée de 22 kD appelée pp22 (176-331 aa) (398). Les deux protéines possèdent le domaine bHLH, mais diffèrent au niveau du domaine N-terminal. La traduction de l'isoforme long ou court dépend de l'épissage alternatif du gène *Tall*, qui est contrôlé par un cadre de lecture ouvert situé en amont du gène (399).

Deux gènes de structures similaires à *Tall* ont été identifiés, soit : *Lyl-1* et *Tal2*. Ils codent pour des facteurs de transcription dont le domaine bHLH est semblable à celui de TAL1. Les gènes *Lyl-1*, *Tal2* ont aussi été identifié suite à des translocations chromosomiques dans les T-ALL (400, 401).

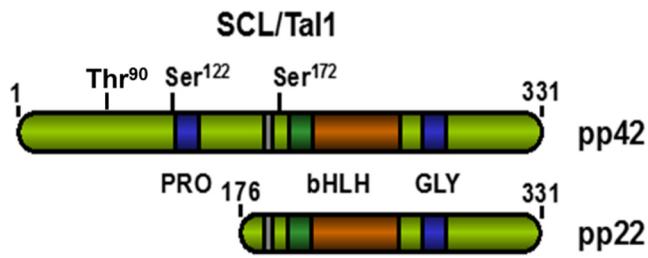


Figure 19. Schéma représentant les deux isoformes de la protéine TAL1.

5.4 Rôle physiologique de TAL1 durant l'hématopoïèse

L'hématopoïèse s'effectue en deux étapes successives appelées hématopoïèse primitive et définitive. C'est le processus par lequel sont générés tous les types de cellules sanguines via la différenciation de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes et des progéniteurs oligopotents (402, 403). Plusieurs études de gènes cibles chez la souris ou dans des cellules en culture ont permis l'identification de plusieurs régulateurs de l'hématopoïèse, dont TAL1 (404). L'inactivation du gène TAL1 dans des modèles murins a mis en évidence son rôle crucial dans l'hématopoïèse normale. En effet, les embryons des souris *Tall^{-/-}* meurent in utero au jour 9,5 de gestation et sont caractérisés par une profonde pâleur, une absence totale d'érythropoïèse embryonnaire ainsi qu'un retard de croissance. De plus, les cellules provenant du sac vitellin mise en culture ne se développent pas en cellules hématopoïétiques, montrant le rôle de TAL1 dans l'hématopoïèse primitive (405, 406). Tant dis que les cellules souches embryonnaires *Tall^{-/-}* ne participent au développement d'aucun lignage hématopoïétique dans des souris chimériques, mettant ainsi en évidence le rôle important de TAL1 dans l'hématopoïèse définitive (407, 408). Ces études ne montrent pas par contre si TAL1 est aussi important lors de

l'hématopoïèse adulte où il est normalement exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs immatures puis uniquement dans les lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires. Pour savoir si TAL1 est aussi requis durant l'hématopoïèse adulte, des modèles murins de mutants conditionnels ont été produits. Dans ces modèles, des séquences exoniques *Tall* ont été encadrées par des séquences lox-P permettant leurs délétions par la recombinase Cre. L'utilisation de la recombinase Cre inducible permet la délétion des séquences *Tall* et donc la perte de fonction de la protéine TAL1 à un temps défini. Les résultats obtenus à partir de ces modèles ont montré que chez l'adulte, l'absence de TAL1 n'affecte pas l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en lignées myéloïdes et lymphoïdes par contre les lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires sont absentes. Autrement dit, durant l'hématopoïèse adulte, TAL1 n'est pas nécessaire aux cellules souches hématopoïétiques, mais il est plutôt requis pour le développement des lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires (409, 410). En plus du rôle dans l'hématopoïèse, il a été démontré que TAL1 était aussi important dans les cellules endothéliales. Une étude a révélé que la mortalité précoce des embryons *Tall*^{-/-} était non seulement due à une hématopoïèse défective, mais également à une angiogenèse altérée avec une incapacité des cellules endothéliales *Tall*^{-/-} à participer à la formation de larges vaisseaux sanguins (411).

5.5 Mécanisme d'action de TAL1 dans les leucémies T-ALL

Le mode d'action exact de TAL1 a longtemps été inconnu. Les premières études ont suggéré que TAL1 exercerait son effet par l'activation de nouveaux gènes dans les leucémies

(412, 413), mais comme l'hétérodimère TAL1/E47 a un faible pouvoir activateur comparé à l'homodimère E47, TAL1 aurait plutôt un effet répresseur (414, 415). Trois modèles ont été proposés pour expliquer son action au niveau des T-ALL. Le premier est l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de facteurs nécessaires à la maturation des thymocytes. En effet, dans les thymocytes normaux, l'homodimère E47 ou bien l'hétérodimère E47/HEB se lie aux boîtes E, recrute les coactivateurs tels que P300 et P/CAF (p300/CBP-associated factor) et active ainsi l'expression des gènes cibles CD4 et le pré-TCR α qui sont importants pour la maturation des cellules doubles négatives ($CD4^- CD8^-$) en cellules doubles positives ($CD4^+ CD8^+$). Une expression aberrante de TAL1 dans les thymocytes immatures lors des T-ALL mène à la formation d'hétérodimères E2A/TAL1 et HEB/TAL1 qui vont lier les boîtes E au niveau du CD44 et du pré-TCR α . Ainsi en interférant avec la fonction des protéines E47 et HEB, TAL1 réprime l'expression de leurs gènes cibles en recrutant les corépresseurs mSin3a et HDAC ce qui perturbe la maturation des thymocytes (416, 417). De plus, il a été démontré que les protéines E47 pouvaient aussi réguler la croissance cellulaire en activant des gènes suppresseurs de tumeurs dans les lymphocytes T, comme les gènes suppresseurs de tumeurs *p16* et *p21* (CIP1), deux inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines. En séquestrant E2A, TAL1 inhibe l'expression de *p16* et *p21* (418, 419). En accord avec ces résultats, les souris transgéniques *E2A*^{-/-} et *HEB*^{-/-} développent des lymphomes à haut grade de malignité et sont caractérisées par un arrêt de la différenciation et une accélération de la maladie, mettant ainsi en évidence le rôle important des protéines E2A et HEB dans les lymphocytes T (412, 418). Plus récemment, une étude visant à identifier de nouvelles cibles impliquées dans les T-ALL par analyses d'expression de gènes suite à la déplétion de TAL1 a démontré que l'hypothèse selon laquelle TAL1 pourrait activer des oncogènes est toujours d'actualité. En effet, ils ont identifié

le gène TRIB2 (Tribbles homolog 2), une pseudo-kinase déjà impliquée dans les leucémies myéloïdes aiguës, comme étant une cible de TAL1, et est aussi requis pour la survie des T-ALL. Dans les cellules hématopoïétiques normales, les auteurs suggèrent que l'homodimère E47 ou bien l'hétérodimère E47/HEB inhibe l'expression du gène TRIB2, par contre l'expression aberrante de TAL1 va induire l'expression de TRIB2 en s'hétérodimerisant avec les protéines E2A, s'opposant ainsi à leur effet répresseur sur TRIB2 (420). Finalement, d'autres études ont attribué un rôle anti-apoptotique à TAL1. En effet, l'activité anti-apoptotique de TAL1 est observée dans les thymocytes des souris transgéniques *Tal1* (421). Tant dis que l'expression d'un dominant négatif de TAL1 dans la lignée lymphocytaire T Jurkat (422), de même que la restauration de l'activité des protéines E2A induit l'apoptose de ces cellules (423).

5.6 Régulation transcriptionnelle par TAL1

Les fonctions de TAL1 sont assurées non seulement par sa propre liaison à l'ADN via son domaine basic, mais aussi par les interactions que TAL1 établit directement ou indirectement avec d'autres protéines nucléaires. En effet, dans les cellules érythroïdes, en plus des facteurs bHLH de classe I, TAL1 s'associe à de nombreux partenaires tout aussi importants pour la croissance, la différenciation et le développement normal des cellules hématopoïétiques. Notamment, GATA-1/3, les protéines nucléaires à domaines LIM, en particulier LMO2, LDB1, une protéine qui se lie aux protéines à domaine LIM (424) et ETO2 (387, 425-427). La protéine LMO2 est une protéine à doigts de zinc, avec deux domaines LIM riches en cystéines, elle est impliquée dans les interactions protéines/protéines et ne contient pas de domaine de liaison à l'ADN. Les gènes *Tal1* et *Lmo2* sont co-exprimés au cours de l'hématopoïèse primitive et définitive et les souris LMO2 KO meurent aussi in utero en raison d'absence de cellules

sanguines dans le sac vitellin (428). De plus tout comme TAL1, LMO2 n'est pas exprimé dans le thymus (429) et une expression aberrante de LMO2 est retrouvée dans 45 % de T-ALL suite à des translocations chromosomiques (430). La protéine GATA-1 est une protéine à doigts de zinc, aussi retrouvée dans les complexes protéiques contenant TAL1. Tout comme TAL1, GATA-1 est exprimé dans les cellules érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires. Les souris GATA-1 KO présentent le même phénotype que celui observé pour TAL1 et LMO2 (431, 432). Ceci suggère que ces trois protéines pourraient avoir des rôles synergiques lors de la différenciation érythroïde. Il a été démontré que le complexe formé par TAL1/E47/GATA-1/LMO2 et LDB1, reconnaît une séquence bipartite composée d'une boîte E de type CAGGTG et d'un motif GATA séparé par 9 à 10 pb, avec LMO2 jouant le rôle de pont entre TAL1 et GATA-1(387). C'est en formant des complexes avec tous ces partenaires que TAL1 régule l'expression de ces gènes cibles. Plusieurs récentes études ont identifié des cibles potentielles pour TAL1. Une première étude a identifié le gène c-kit codant pour le récepteur C-KIT et a montré que le complexe pentamérique TAL1/E2A/GATA-1/LMO2/LDB1 réprime le gène c-kit en recrutant en plus la protéine Rb dans les érythroblastes matures (433). Cependant, il arrive aussi que le gène c-kit soit activé par TAL1, dans ce cas-là, la liaison à l'ADN se fait indirectement sur un motif riche en GC à travers une liaison à la protéine Sp1 déjà lié au promoteur de c-kit, cette liaison ne nécessite donc pas de boîte E, ni de motif GATA (388). Un autre gène régulé positivement par TAL1 est RALDH2 (Retinaldehyde Dehydrogenase 2), cette fois-ci le complexe TAL1/LMO2 s'associe avec GATA-3 sur un motif GATA (434). Il y a aussi la protéine érythroïde EPB 4.2 (P4.2), protéine importante du squelette membranaire des cellules érythrocytaires (435). Dans les cellules érythroleucémiques murines différenciées, le promoteur du gène codant pour la protéine 4.2 contient deux motifs bipartites (boîte E-GATA),

chacun est associé à un complexe transactivateur TAL1/GATA-1/E47/LMO2/LDB1. Les deux complexes interagissent en se liant à un dimère LDB1 formant ainsi une boucle (426, 435). À l'inverse, dans les cellules érythroleucémiques murines non différenciées, TAL1 recrute la démethylase LSD-1 (lysin specific demethylase 1) pour réprimer l'expression de P4.2 (436). Plus récemment, une étude a mis en évidence l'existence d'un circuit de régulation transcriptionnelle contrôlé par un complexe formé par TAL1, RUNX1 et GATA-3 dans les T-ALL. TAL1 forme avec RUNX1 et GATA-3 une boucle d'autorégulation positive et interconnectée qui mène à l'activation de l'oncogène MYB, qui à son tour régule l'expression des gènes cibles de TAL1, permettant de ce fait de renforcer et de stabiliser l'effet oncogénique de TAL1 (437).

En plus de s'associer à ses partenaires hématopoïétiques habituels, TAL1 recrute des coactivateurs et des corépresseurs qui possèdent des activités enzymatiques capables de modifier les histones tels que les histones acétyltransferases et méthyltransferases. Ce sont ces interactions qui vont déterminer si TAL1 agira comme répresseur ou activateur de l'expression génique. TAL1 réprime la transcription en recrutant mSin3 (438) et HDAC1/2 (436), LSD1 (Lysine Specific Demethylase 1) (396) et ETO-2 (439). Pour activer la transcription TAL1 s'associe avec les coactivateurs P300 et P/CAF (440, 441). Certains comme PADI4 (peptidylarginine deiminase IV) agissent comme coactivateurs ou corépresseurs pour TAL1 dépendamment du contexte (442, 443).

6 Hypothèses et objectifs

Les anomalies chromosomiques et génomiques au niveau du locus 3p21.3 sont des événements fréquents liés aux cancers épithéliaux, notamment les cancers de l'ovaire et du sein. C'est dans cette région que se retrouvent les gènes hyaluronidases HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3. HYAL-1 est particulièrement surexprimé dans plusieurs cancers, notamment celui de la prostate, la vessie, le cou, la tête et le sein. **Le premier article** s'appuie sur des résultats obtenus précédemment où nous avions démontré que l'expression de l'ARNm de HYAL-1 était aussi élevée dans les lignées cellulaires et chez les patientes ayant un cancer épithelial de l'ovaire (CEO) de type mucineux et à cellules claires, mais pas dans les types endométrioïdes et séreux. Cette expression élevée de HYAL-1 était inversement corrélée avec celle d'ER α (444). De plus, il a été rapporté que les lignées du cancer du sein ER (-) ont aussi un niveau élevé de HYAL-1 par rapport aux lignées ER (+) (445). Malgré le fait que le rôle de HYAL-1 et d'ER α soit bien établi dans les cancers gynécologiques, le mécanisme de cette régulation est tout à fait inconnu. La régulation de l'expression du gène HYAL-1 était jusqu'à là inconnue et seule une étude s'y est intéressé dans le cancer de prostate. Elle a mené à l'identification du promoteur proximal de HYAL-1 (-93 +17) et a révélé des sites consensus de liaison pour certains facteurs de transcription tels que Sp1, egr-1, AP-2 et NFkB (446). Dans cette étude, notre hypothèse était que HYAL-1 est un gène cible d'ER α et que l'expression de HYAL-1 est négativement régulée par ER α . **L'objectif est : d'investiguer le mécanisme de la répression du gène HYAL-1 par le récepteur de l'estrogène ER α dans le cancer du sein.**

En plus de réguler l'expression de nombreux gènes, les ERs sont eux-mêmes régulés. L'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes repose sur trois facteurs : la liaison du ligand, estrogène ou anti-estrogène, le recrutement de cofacteurs et les modifications post-

traductionnelles notamment la phosphorylation due à la signalisation des facteurs de croissance sur les voies des MAPKs et PI3-K. En effet, la phosphorylation des ERs en réponse à la signalisation intracellulaire affecte leur activité transcriptionnelle en modulant leur interaction avec des cofacteurs. **Le deuxième article** repose des résultats précédents dans notre laboratoire, qui ont démontré que l'augmentation de la phosphorylation des ERs par la kinase Erk se traduit par des effets semblables à ceux induit par l'estrogène dans les tissus sensibles aux hormones (143, 192, 447). Ceci met en évidence un rôle important pour la phosphorylation de l'AF-1 du récepteur pour maintenir la capacité transcriptionnelle des ERs conjointement ou non avec l'hormone et fournir ainsi une voie alternative pour induire une croissance cellulaire indésirable dans les cancers gynécologiques même en absence de l'hormone. Dans le but d'identifier de nouveaux cofacteurs des ERs au niveau de l'AF-1, dépendants de la phosphorylation et qui pourraient perturber la régulation des ERs, nous avons effectué des essais de criblage d'interaction de type protéine-protéine, en utilisant la portion N-terminal d'ER β phosphorylée par la MAPK/ Erk1. À partir de cet essai, nous avions identifié une protéine appelée TAL1 comme pouvant interagir avec ER β phosphorylé. Notre hypothèse était que TAL1 est un cofacteur des récepteurs des estrogènes et qu'il régule leur activité transcriptionnelle. **Les objectifs sont de :**

- 1. Déterminer le mécanisme d'action de TAL1 sur la régulation transcriptionnelle des ERs.**
- 2. Caractériser le rôle de TAL1 dans la tumorigénèse mammaire.**

Chapitre 2 Résultats

1^{ère} publication

Proximal and distal regulation of the HYAL1 gene cluster by the estrogen receptor α in breast cancer cells

Lydia Edjekouane^{1,2}, Samira Benhadjeba^{1,2}, Maïka Jangal³, Hubert Fleury⁴, Nicolas Gévr^y³, Euridice Carmona⁴ and André Tremblay^{1,2,5}

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1 Canada

⁴CHUM Research Center, Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, H2X 0A9 Canada

⁵Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

Short title: HYAL1 gene regulation by ER α

Keywords: Hyaluronidase; HYAL1; HYAL2; HYAL3; estrogen receptors; ER α cistrome analysis, histone acetylation, histone methylation; 3p21.3 cluster; breast cancer

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to : André Tremblay, Research Center, CHU Ste-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca

Permission de l'éditeur de la revue

COPYRIGHT AND LICENSE POLICIES

Open-Access License No Permission Required



Oncotarget applies the [**Creative Commons Attribution 3.0 License**](#) (CC BY 3.0) to all works we publish (read the [**human-readable summary**](#) or the [**full license legal code**](#)). Under the CC BY, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in *Oncotarget*, so long as the original authors and source are cited.

No permission is required from the authors or the publishers.

In most cases, appropriate attribution can be provided by simply citing the original article. If the item you plan to reuse is not part of a published article (e.g., a featured issue image), then please indicate the originator of the work, and the volume, issue, and date of the journal in which the item appeared. For any reuse or redistribution of a work, you must also make clear the license terms under which the work was published. This broad license was developed to facilitate open access to, and free use of, original works of all types. Applying this standard license to your own work will ensure your right to make your work freely and openly available. For queries about the license, please contact us at forms@oncotarget.com

Contributions des auteurs

Lydia Edjekouane : À titre de premier auteur, en me basant sur les résultats préalables obtenues lorsque j'étais à la maîtrise, j'ai mis au point les conditions expérimentales, j'ai réalisé et analysé la majorité des expériences présentées dans le papier et fais les corrections nécessaires.

Samira Benhadjeba : Une étudiante au doctorat dans notre laboratoire. Samira a participé activement aux discussions et m'a apporté son aide à de nombreuses reprises.

Dr. Nicolas Gévry et son étudiante Maïka Jangal ont réalisé les analyses de type ChIP-Seq des figures 2A et 5.

Dre Euridice Carmona : A collaboré avec le Dr. Tremblay lorsque j'étais son étudiante à la maîtrise. Elle a aussi effectué avec son étudiant Hubert Fleury les analyses METABRIC de la figure 4 et du tableau 1.

Dr André Tremblay : En tant que directeur de laboratoire, Dr. Tremblay a supervisé et a participé à la conception du projet. Il a écrit et corrigé l'article

Abstract

Chromosomal and genome abnormalities at the 3p21.3 locus are frequent events linked to epithelial cancers, including ovarian and breast cancers. Genes encoded in the 3p21.3 cluster include HYAL1, HYAL2 and HYAL3 members of hyaluronidases involved in the breakdown of hyaluronan, an abundant component of the vertebrate extracellular matrix. However, the transcriptional regulation of HYAL genes is poorly defined. Here, we identified the estrogen receptor ER α as a negative regulator of HYAL1 expression in breast cancer cells. Integrative data mining using METABRIC dataset revealed a significant inverse correlation between ER α and HYAL1 gene expression in human breast tumors. ChIP-Seq analysis identified several ER α binding sites within the 3p21.3 locus, supporting the role of estrogen as an upstream signal that diversely regulates the expression of 3p21.3 genes at both proximal and distal locations. Of these, HYAL1 was repressed by estrogen through ER α binding to a consensus estrogen response element (ERE) located in the proximal promoter of HYAL1 and flanked by an Sp1 binding site, required to achieve optimal estrogen repression. The repressive chromatin mark H3K27me3 was increased at the proximal HYAL1 ERE but not at other EREs contained in the cluster, providing a mechanism to selectively downregulate HYAL1. The HYAL1 repression was also specific to ER α and not to ER β , whose expression did not correlate with HYAL1 in human breast tumors. This study identifies HYAL1 as an ER α target gene and provides a functional framework for the direct effect of estrogen on 3p21.3 genes in breast cancer cells.

Introduction

Mammalian hyaluronidases are involved in the hydrolysis of the glycosaminoglycan hyaluronan, a critical component of the extracellular matrix that regulates cell growth, migration, and differentiation, and other processes such as extracellular water and protein homeostasis, cartilage and vascular integrity. Family members include HYAL1, HYAL2, and HYAL3, clustered in the 3p21.3 chromosomal region, and HYAL4, SPAM1 (sperm adhesion molecule 1; also known as PH-20/HYAL5) and HYALP1, encoded on chromosome 7q31.3. Of these, only HYAL1, HYAL2 and SPAM1 act as *bona fide* hyaluronidases with genuine endo-N-acetylhexosaminidase activity, whereas HYAL3 is considered inactive, HYAL4 possesses chondroitinase activity and HYALP1 is a pseudogene [1, 2]. HYAL1 acts as the most potent hyaluronidase, being highly present in a broad range of tissues and in plasma, and exhibiting wider substrate recognition, which suggests a central role of HYAL1 in hyaluronan fragmentation and extracellular matrix turnover [3, 4]. Mutations in human hyaluronidase-coding genes have as yet been identified only in HYAL1, resulting in lysosomal disorders and juvenile idiopathic arthritis [5, 6].

Increasing evidence supports a role of hyaluronidases in tumorigenesis and metastatic potential mostly associated with changes in hyaluronan breakdown profile. Intriguingly, expression levels of hyaluronidases are variable in a cancer type-dependent fashion, providing them with either oncogenic or tumor suppressor activity. Increased HYAL1 levels were found to correlate with tumor aggressiveness and poor survival in head and neck, prostate and bladder cancer [7-9], whereas HYAL1 expression was decreased in advanced

ovarian carcinomas and in endometrial cancer [10-12]. Chromosomal aberrations and instability at the 3p21.3 locus and homozygous deletions targeting HYAL1/2/3 have been frequently found in many epithelial cancers, suggesting a potential role of tumor suppressor for the genes encoded at this locus [13-15]. In ovarian cancer, allelic imbalance of the HYAL1/2/3 clustered genes was reported in tumor and stroma tissues, and in particular, HYAL1 expression was significantly reduced in serous epithelial ovarian cancer compared to normal ovaries or to other ovarian cancer subtypes [10, 16, 17]. Consistent with such HYAL1 reduction, extracellular accumulation of hyaluronan is often observed in ovarian tumor stroma and pericellular matrix with correlation to poor disease outcome [3, 18].

Aberrant expression of HYAL1, HYAL2 and SPAM1 has also been reported in breast cancer, and in particular upregulation of HYAL1 was observed in infiltrating invasive duct cancer tissues and metastatic lymph nodes [19, 20]. Overexpression of HYAL1 also induced migration of breast cancer cells and promoted xenograft tumor size and angiogenesis [21]. Therefore, the effect of HYAL1 appears to be highly context-dependent in terms of cancer type and progression. Although aberrant HYAL1 expression often correlates with increased tumor malignancy involving unstable 3p21.3 locus activity, the mechanism regulating HYAL1 expression and other genes at this locus in cancer cells remains poorly understood.

Transcriptional regulation of estrogen target genes is mediated through direct interaction with the estrogen receptors ER α (NR3A1) and ER β (NR3A2), which belong to the nuclear hormone receptor family of ligand activated transcription factors [22]. ER α and ER β bind to their cognate estrogen responsive element (ERE) in target promoters to mediate transcriptional regulation of estrogen-responsive genes. Interestingly, ER α -negative breast

cancer cells, which tend to be more aggressive, exhibit enhanced hyaluronidase secretion when compared to ER α -positive cells [23]. We reported a similar inverse correlation for epithelial ovarian cancers in which clear cell and mucinous subtypes showed strong expression of HYAL1 but low levels of ER α [17]. In contrast, in serous and endometrioid tumors expressing high levels of ER α , HYAL1 was weakly expressed. In addition, ectopic expression of ER α in TOV21G ovarian cancer cells, which are derived from a clear cell carcinoma, resulted in a significant decrease in HYAL1 expression [17]. These findings support an inverse relationship between HYAL1 and ER α expression at least in ovarian and breast cancer cells, but the exact reason for such correlation remains undetermined.

In the current study, we show that the HYAL1 gene is a target of ER α in breast cancer cells. Analysis of the ER α cistrome identified several ER α binding sites within the 3p21.3 cluster, including in the vicinity of the HYAL1 gene, which were associated with histone marks in response to estrogen. Interestingly, among the 3p21.3 genes tested, only HYAL1 was found repressed by estrogen, indicating a selective role of these specific ER α binding elements to differentially support the estrogenic response of 3p21.3 genes in breast cancer cells.

Results

HYAL1 expression is down-regulated by estrogen in breast cancer cells

Our previous results have demonstrated an inverse correlation between HYAL1 and ER α expression in epithelial ovarian cancer cells, suggesting an estrogenic regulation of the HYAL1 gene in ER α positive cancer cells [17]. To investigate the possible regulation of HYAL1 by estrogen, we used human breast cancer MCF-7 cells, which are positive for ER and highly responsive to estrogen. When treated with 17 β -estradiol (E2), MCF-7 cells exhibited a significant decrease in HYAL1 expression compared to control cells, whereas TFF1/pS2 and GREB1, two known estrogen inducible genes, were increased under the same conditions (Fig. 1A, *left panel*). Such estrogenic decrease in HYAL1 expression was shown to take place in a time- and dose-dependent manner (Fig. S1). Similarly, HYAL1 was repressed in human breast cancer BT-474 cells, which also exhibit high expression of ER α (Fig. 1A, *right panel*). Addition of the mixed antiestrogen tamoxifen also decreased HYAL1 expression in both cell lines, albeit to a lesser extent than with estrogen, whereas pure antiestrogen ICI 182,780, also known as fulvestrant, had no effect. Corresponding changes in protein levels were observed in MCF-7 and BT-474 cells with a stronger reduction of HYAL1 protein in response to estrogen, compared to tamoxifen and ICI 182,780 (Fig. 1B). Under these conditions, ER α protein levels were moderately affected, except in presence of ICI 182,780, in accordance with its reported effect on ER α degradation [24]. Consistent with the inverse correlation of HYAL1 and estrogen, MCF-7 and BT-474 cells showed reduced basal levels of HYAL1 protein when compared to ER α -negative breast cancer MDA-MB-

231 and ovarian epithelial cancer TOV21G cells, which are both strongly positive for HYAL1 (Fig. S2).

Regulation of the 3p21.3 cluster genes by estrogen in breast cancer cells

We next addressed whether such down-regulation of HYAL1 was also occurring on the other closely located genes within the 3p21.3 locus as represented in Fig. 2A. We found that the expression levels of SEMA3F, SEMA3B and RASSF1A genes were increased in MCF-7 cells in response to estrogen, whereas those of NAT6, TUSC2 and most notably HYAL2 and HYAL3 were not significantly changed compared to control cells (Fig. 2B). This indicates that among the genes studied in the 3p21.3 locus, HYAL1 gene exhibits a selective response to estrogen, with a marked reduction in its expression. A similar expression profile was also observed in cells treated for a shorter period of time (*e.g.* 6 hrs), indicating a rapid response of 3p21.3 HYAL1, SEMA3B and SEMA3F genes to estrogen (Fig. S3). Treatment with tamoxifen or ICI 182,780 had no significant effect on the expression of most of the genes within the 3p21.3 cluster, except for SEMA3F and SEMA3B, which were increased by tamoxifen (Fig. 2B).

Selective down-regulation of HYAL1 by ER α

Because MCF-7 cells are positive for both ER α and ER β isoforms, the respective contribution of each isoform in down-regulating HYAL1 with estrogen is difficult to

ascertain. To address this, we treated MCF-7 cells with the selective agonist propylpyrazole-triol (PPT) for ER α or diarylpropionitrile (DPN) for ER β and analyzed HYAL1 expression. We found that PPT significantly decreased HYAL1 levels in contrast to DPN which had no effect (Fig. 3A), suggesting a predominant role of ER α to down-regulate HYAL1. To further define the respective role of ER α and ER β in HYAL1 regulation, we generated stable clonal lines using ER-negative human breast cancer MDA-MB-231 cells, which are positive for HYAL1 (Fig. S2), and in which ER α (231-ER α) or ER β (231-ER β) was stably expressed and functional (Fig. S4). HYAL1 gene expression was found significantly decreased in 231-ER α cells treated with estrogen compared to untreated cells, whereas no changes were observed in 231-ER β cells (Fig. 3B). In addition, HYAL1 protein levels were lower in 231-ER α cells compared to 231-mock or to 231-ER β cells, and were further reduced by the addition of estrogen (Fig. 3C). These results suggest that HYAL1 down-regulation by estrogen is mediated through ER α and not ER β in the context of breast cancer cells.

Inverse correlation of HYAL1 and ESR1 in breast cancer clinical samples

To determine the clinical relevance of our findings, we interrogated the METABRIC gene expression microarray dataset consisting of 1980 clinically annotated breast cancer specimens [25-27]. Integrative data mining analysis was performed to plot the mean values of mRNA expression for ESR1 (ER α gene) and HYAL1 in the whole cohort and in each of the breast cancer subtypes, i.e. luminal A, luminal B, normal-like, basal-like and HER2, as classified by the PAM50 assay [28, 29]. Our results show a striking inverse correlation

between the expression levels of these two genes in all breast cancer subtypes (Fig. 4A). In the whole cohort, values are close to zero because gene expression were normalized and expressed as z-score values (see Methods for details). We further conducted a more specific correlation study taking into account expression values in each patient. We thus performed Pearson correlation analyses which revealed a significant negative correlation (Pearson $r = -0.15$, $p < 0.0001$, $n=1980$) between ESR1 and HYAL1 in the whole cohort, as well as in luminal A (Pearson $r = -0.095$, $p = 0.011$, $n=781$) and luminal B (Pearson $r = -0.094$, $p = 0.039$, $n=488$) subtypes (Fig. 4B-D, Table 1), which are the two subtypes with positive ESR1 expression (Fig. 1A). An inverse correlation almost reaching significance was also observed in the normal-like subtype (Pearson $r = -0.13$, $p = 0.059$, $n=199$) (Fig. 4E), whereas no significant correlation was measured for basal-like and HER2-enriched subtypes (Fig. 4F-G). Furthermore, we found no significant correlation between gene expression of ESR1 and HYAL2, between ESR1 and HYAL3, or between ESR2 (ER β gene) and HYAL1 (Table 1), consistent with our results in cells (Figs. 2, 3, and S3). In addition, a significant positive correlation was observed between ESR1 and SEMA3B gene expression and ESR1 and SEMA3F (Table 1), two genes that were upregulated by estrogen (Figs. 2 and S3). These findings indicate that HYAL1 regulation by ER α is specific and clinically relevant.

ER α cistrome analysis of the 3p21.3 cluster

Given the prominent role of ER α in HYAL1 down-regulation, we then performed ER α ChIP-seq data analysis in order to identify putative ER α binding sites in the vicinity of the

HYAL1 gene and within the 3p21.3 cluster. Thus, we identified 69452 ER α binding sites in MCF-7 treated cells. Interestingly, our analysis revealed several binding sites occupied by ER α in the 3p21.3 cluster in absence and in presence of estrogen (Fig. 5A). In particular, several of the estrogen-induced ER α binding sites were located in the vicinity of SEMA3B, SEMA3F, and RASSF1, three genes we found upregulated by E2 (Fig. 2B and Fig. S3), suggesting that these sites are primarily used to confer estrogen activation. To delineate whether enrichment of the identified ER α binding sites by estrogen were associated with active transcription, we performed ChIP-Seq analysis under the same conditions to map the acetylated form of lysine 27 of histone 3 (H3K27Ac), a histone mark associated with transcriptional activation. As expected, ER α binding sites along the SEMA3B, SEMA3F and RASSF1 genes correlated with H3K27Ac mark, indicating the potential role of these sites in mediating estrogen-activation of these genes (Fig. 5A). Similarly, enrichment of ER α and H3K27Ac mark was also found around the HYAL3 gene (HYAL3 is encoded by the bottom DNA strand), but this region does not seem to confer estrogen activation of HYAL3 since no significant regulation in expression was observed in treated MCF-7 cells (Fig. 2B and Fig. S3) and ESR1 and HYAL3 gene expression did not correlate in breast tumors (Table 1). Interestingly, the genomic region (up to ~10kb) located 5' to the HYAL1 gene (reverse orientation) did not display significant enrichment in H3K27Ac mark in presence of estrogen, suggesting a weakly responsive state of chromatin near HYAL1 in these conditions. However, our analysis has identified one ER α binding site located within the proximal promoter of HYAL1 (*i.e.* ERE-900), along with other distal sites, such as ERE-13500 and ERE-32250, located toward respectively HYAL2 and RASSF1.

We thus performed ChIP-qPCR analysis to validate these ER α binding sites identified within the 3p21.3 cluster near the HYAL1 gene. Control ChIP experiments showed a strong recruitment of ER α at the TFF1 gene (Fig. S4). Under the same conditions, we found that all the binding sites tested within the 3p21.3 locus identified from our ChIP-Seq analysis were able to recruit ER α in MCF-7 cells treated with estrogen, whereas the antiestrogens did not allow significant enrichment (Fig. 5B). Of interest, the ERE-900, ERE-13500, and to a lesser extent ERE-32250 were found to be the most enriched ER α binding sites in response to estrogen, when compared to other EREs of the cluster (*e.g.* ERE-42430 and ERE-50130). To address whether these sites correlate with transcriptional repression in accordance with the down regulation of HYAL1 by estrogen (Fig. 1A and Fig. 3), we performed ChIP assay for the histone H3K27me3 repressive mark. The methylation of H3K27 is catalyzed by the polycomb repressive complex 2 (PRC2) member enhancer of zeste homolog 2 (EZH2/KMT6A), which has been associated with repression of estrogen-responsive genes and with the severity and progression of breast cancer [30, 31]. We found that the ERE-900 was strongly associated with the H3K27me3 mark in presence of estrogen, in contrast to more distal sites (Fig. 5C), suggesting that the ERE-900 located in the proximal promoter of HYAL1 is linked to estrogenic repression. Sequence analysis near the ERE-900 revealed the presence of two putative Sp1 binding sites at positions -60 and -1020. Besides direct interaction with EREs, estrogen regulation of ER α target genes can be mediated through direct interactions with other transcription factors, such as Sp1 [32]. We found a significant enrichment of ER α to the Sp1-1020 site compared to the Sp1-60 in response to estrogen (Fig. 6A). This enrichment was accompanied by a strong increase in H3K27me3 mark at the

Sp1-1020 site (Fig. 6B). These results suggest that the repressive action of estrogen on HYAL1 implies ER α recruitment to the ERE-900, probably depending on the adjacent Sp1 binding region, and that such recruitment might cooperate with the PRC2 complex to induce H3K27me3 enrichment at the HYAL1 promoter.

Estrogen repression of the HYAL1 promoter requires ERE-900

We isolated a 1282 bp fragment of the proximal region immediately flanking the transcription start site of HYAL1 and tested its response to estrogen using luciferase assay. We found that in 293 cells transfected with ER α , the HYAL1 promoter region, containing the ERE-900 and the Sp1-1020 sites, conferred transcriptional repression in response to estrogen (Fig. 7A). In contrast to ER α , ER β expression was inefficient in promoting a similar repression, in accordance with results obtained using selective agonists and stable 231 cell lines (Fig. 3). 5' deletions of the HYAL1 promoter showed that removal of the Sp1-1020 impaired the repressive action of estrogen and further removal of the ERE-900 completely abolished both the effect of ER α ectopic expression and estrogen treatment, compared to full-length promoter (Fig. 7B). A disrupting site mutation of the ERE-900 also abolished these effects, suggesting an indispensable role of the ERE-900 in mediating HYAL1 promoter repression. Consistent with this, the ERE-900 was found essential for the repressive action of estrogen in MCF-7 (Fig. 7C) and in BT-474 (Fig. S6) breast cancer cells, while deletion of the Sp1-1020 site slightly diminished but did not abolish the down-regulation by estrogen. Likewise, disruption of the ERE-900 completely impaired the

repressive effect of ER α expression and activation on HYAL1 promoter in TOV21G ovarian epithelial cancer cells (Fig. 7D), in which HYAL1 expression is known to inversely correlate with ER α (Fig. S2 and ref. [17]). These results suggest a predominant role of ERE-900 in ER α -mediated repression of HYAL1 in estrogen responsive cancer cells.

Discussion

Increasing evidence supports a role of hyaluronidase family members in tumor progression and metastasis, but the exact regulatory mechanisms underlying the highly variable and context-dependent expression profiles of HYAL genes in terms of cancer type and severity still remain poorly understood. Here, we report a distinct and selective response to estrogen among the 3p21.3 locus genes in breast cancer cells, where the HYAL1 gene was repressed as compared to HYAL2 and HYAL3, and to other genes tested within the cluster. This negative regulation of HYAL1 by ER α provides a mechanism supporting the specific inverse correlation we found between ESR1 and HYAL1, but not with HYAL2 or HYAL3 in the METABRIC cohort consisting of 1980 cases of breast cancer. Despite the fact that most of ER α binding sites present in the 3p21.3 locus were associated with active chromatin marks in response to estrogen, HYAL1 expression was decreased by estrogen treatment, accompanied by the enrichment of repressive H3K27me3 mark. These results identify HYAL1 as an ER α target gene with clinical relevance and suggest a differential role of the specific ER α binding elements in the selective regulation of the 3p21.3 genes in response to estrogen.

Considerable work has been made to improve our understanding of hormone-dependent gene activation by ER α , but relatively little is known about how estrogen represses gene expression. Our results demonstrate that estrogen repression of HYAL1 involves direct binding of ER α to the ERE-900 element located in the proximal HYAL1 promoter region, accompanied with enrichment of the repressive H3K27 tri-methylation mark. Aberrant epigenetic events, including histone modifications, are central to alter gene expression

profiles, a hallmark of cancer development. In breast cancer, histone hypermethylated marks are frequently associated to genes involved in cell-cycle regulation, apoptosis, tissue invasion and metastasis [33, 34]. In particular, the methyltransferase EZH2/KMT6A and its end-product H3K27me3 mark are found elevated in aggressive breast cancer subtypes, including triple negative and ER α -positive tumors resistant to endocrine therapies, suggesting inactivation of tumor suppressor genes [31, 35-38]. Our results demonstrate that H3K27 methylation profile associated with the ER α binding sites identified throughout the 3p21.3 cluster is highly variable, suggesting the potential of estrogen to selectively up- or down-regulate specific genes within this cluster. Accordingly, some of these ERE elements were associated with the transcriptionally active H3K27 acetylation mark, probably sustaining a positive response to estrogen for genes such as SEMA3B, SEMA3F and RASSF1A. Class 3 semaphorins B and F are candidate tumor suppressors and their increased response to estrogen has been reported in ovarian cancer cells, resulting in inhibition of cell growth [39-41]. Whether these effects are translated through the same EREs identified in this study is not known but our results indicate that a similar estrogen up-regulation of SEMA3B and 3F expression is also taking place in breast cancer cells, and is consistent with the positive correlation we found between ESR1 and SEMA3B or SEMA3F in human breast tumors using METABRIC dataset.

For HYAL1 repressive response, the exact mechanism as to how estrogen can induce H3K27 tri-methylation at the HYAL1 promoter is not clearly known. However, based on recent evidence showing that EZH2 can be transcriptionally induced by estrogen in breast cancer cells [42], this might provide a mechanism by which the methylation of H3K27 can be

promoted by estrogen in conjunction with the direct recruitment of ER α at the HYAL1 ERE-900. Consistent with this, ER α recruitment and H3K27me3 repressive mark enrichment at HYAL1 promoter is strongly correlated since treatment with antiestrogen ICI-182,780 or tamoxifen did not result in significant changes in ER α and H3K27me3 levels at the ERE-900. Such requirement of specific epigenetic landmarks was found essential to provide stringent response of ER α to estrogen [43], as exemplified for the estrogen-responsive BCL2 promoter [44], thereby supporting a role of the chromatin environment to impose ligand dependency of ER α activity. Interestingly, estrogen was shown to promote interaction of ER α but not ER β with EZH2 on target promoters of treated MCF-7 cells [45]. Such ER isoform selective effect is consistent with our findings on the ability of ER α and not ER β to repress the HYAL1 gene. Whether the enrichment of the H3K27me3 mark at the HYAL1 promoter requires prior ER α binding and/or specific EZH2 recruitment to estrogen-bound ER α at the ERE-900 element is not known, but the repressive chromatin landscape triggered by estrogen in the region of HYAL1 appears highly specific when compared to other distal EREs located in the 3p21.3 cluster. Indeed, most of the validated EREs shown to recruit ER α in response to estrogen were not enriched with H3K27me3 repressive mark, suggesting that estrogen promotes a gene-specific chromatin remodelling at the 3p21.3 cluster.

We examined the involvement of Sp1 binding sites in translating estrogen responsiveness of HYAL1 and found a contributing role of Sp1-1200 site located in the vicinity of ERE-900. A functional Sp1 binding element has been correlated with low HYAL1 expression in bladder and prostate cancer cells [46], suggesting that Sp1 might impair the promoter activity of HYAL1. However, this Sp1 element, which corresponds to Sp1-60 in this study, did not

seem to promote the repressive action of estrogen in breast cancer cells. Sp1 is an interaction partner of ER α , which in most cases confers estrogen responsiveness to its target genes without the prior requirement of ER α binding to an ERE [32]. In the HYAL1 response to estrogen, both the ERE-900 and the Sp1-1020 elements seem to be required, suggesting that prior binding of ER α and Sp1 to their respective sites is needed to achieve optimal HYAL1 repression. This appears not to be a common aspect of estrogen-responsive genes that are regulated via Sp1-ER α interaction, which in most cases do not require direct ER α binding to DNA [32, 47-49]. For HYAL1, both the ERE and Sp1 sites are required to confer optimal estrogenic downregulation, adding to the possible actions of ER α -mediated repression. Whole genome location analyses have depicted enrichment of Sp1 binding sites in close proximity of EREs, which better predict functional ER α /Sp1 complex interaction and response to estrogen [50-52].

In addition, our observation of enhanced estrogenic ER α recruitment around the HYAL1 promoter is not always a shared feature for repressed genes. For example, estrogenic down-regulation of BTG2 and E-Cadherin genes does not involve increased ER α occupancy at their respective promoters [48, 53]. Such induced recruitment of ER α at the HYAL1 promoter might therefore promote appropriate changes in the chromatin environment leading to histone modifications such as the H3K27me3 mark as suggested by our data. Additional changes might as well implicate recruitment of transcriptional corepressors. For example, nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT have been shown to be recruited at promoters of ER α /Sp1 repressed genes, such as VEFGR2 and CCNG2 [47, 54]. However, we did not find any changes in NCoR/SMRT recruitment at the HYAL1 promoter in

response to estrogen (data not shown), suggesting a possible involvement of other cofactors yet to be identified. For instance, coregulators such as RIP140 and REA have been associated to the repressive actions of estrogen on respectively PROS1 and BTG2 genes in the context of ER α and Sp1 [48, 55]. Whether these or other coregulators are involved in ER α -mediated HYAL1 repression remains to be investigated. However, our results outline a possible mechanism that mediates estrogen-dependent down-regulation of HYAL1, which contributes to expand the diverse nature of processes used by ER α to regulate gene repression.

Chromosomal instability at the 3p21.3 locus and aberrant expression of hyaluronidase family members associated to deleterious effects of hyaluronan breakdown end-products have been linked with poor prognosis and metastasis of many epithelial cancers [13-15]. However, expression levels of HYAL1/2/3 isoforms were found to be highly variable depending of cancer types, raising the complexity of regulatory mechanisms involved. Our identification of ER α as a regulatory transcriptional component of the 3p21.3 genes, and in particular of HYAL1, reveals a probable link between breast cancer subtypes and metastatic potential. Upregulation of HYAL1 has been observed in infiltrating invasive duct tumors and metastatic lymph nodes and shown to promote migration potential [19-21]. Our data mining analysis using the METABRIC dataset did reveal a significant negative correlation between HYAL1 and ESR1 genes in breast tumors, providing a clinical relevance to the direct down-regulation of HYAL1 by estrogen. We have also reported such negative relationship in ovarian tumors, in which poor prognosis morphological subtypes, such as clear cell and mucinous tumors, exhibit high HYAL1 expression levels that are inversely correlated with

ER α expression [17]. Such stratification based on HYAL1 expression in concordance with ER α status in breast cancer subtypes is suggested with our results showing significant lower expression of HYAL1 in breast tumors highly expressing ESR1, such as luminal A and luminal B subtypes. Furthermore, we observed a reduction of HYAL1 expression in response to estrogen in ER α -positive breast cancer cells and to ectopic expression of ER α in ER α -negative cells. Interestingly, these effects solely relied on ER α and not ER β , which has a limited clinical value [56, 57] and did not reach significance when compared to HYAL1 expression in this study. In such context, it would be interesting to address the potential of HYAL1 upregulation to associate with metastatic phenotype and/or tumor resistance resulting in poor prognosis. Consistent with such HYAL1 increase, low molecular weight products of hyaluronan breakdown were enhanced in aggressive breast tumors and ER α -negative cell lines, providing these fragments with a potential clinical value for breast cancer metastasis [58].

In conclusion, the regulation of gene expression at the 3p21.3 locus is certainly complex and diverse with a direct impact on tumorigenesis in cases of aberrant regulation. Our study provides a functional framework for the direct action of ER α and hormonal regulation of 3p21.3 genes and on its repressive effect on HYAL1 gene with clinical relevance. Understanding the mechanism of HYAL1 gene repression as part of the physiopathological actions of estrogen should provide essential insights and reveal potential therapeutic strategies.

Materials and methods

Cell culture and treatments

Human breast cancer MCF-7 and BT-474 cells were routinely maintained in DMEM supplemented with 10% FBS (Wisent Inc., St-Bruno, QC). ER-negative human MDA-MB-231 breast cancer cells were transfected with expression vectors for ER α and ER β and resistant clones were selected with neomycin to generate 231-ER α and 231-ER β cell lines, respectively. Stable clones were functionally validated for their respective expression of ER α and ER β by Western analysis and for their estrogenic response by luciferase assay. Human epithelial ovarian cancer TOV21G cells were derived from clear cell carcinoma [17] and cultured in OSE medium supplemented with 10% FBS (Wisent Inc.). Human embryonic kidney 293 cells were maintained in DMEM and 5% FBS. Unless otherwise stated, cells were treated with 10nM 17 β -estradiol (E2; Sigma), 100nM 4-hydroxy-tamoxifen (OHT) and 100nM ICI 182,780 and compared to vehicle-treated cells. Cells were also treated with specific agonist propylpyrazole-triol (PPT) for ER α or diarylpropionitrile (DPN) for ER β obtained from Tocris.

HYAL1 promoter constructs and mutagenesis

The HYAL1 proximal promoter fragments were amplified by PCR according to GenBank sequence of the HYAL1 gene contig (NG_009295) and the UCSC hg19 genome assembly (<https://genome.ucsc.edu>). Amplified fragments corresponding to 1282pb (P1), 1060bp (P1 Δ 1020), and 746pb (P1 Δ 900) from HYAL1 transcriptional start site were inserted in front of the luciferase coding region in pBLuc plasmid as described [59]. Site-directed

mutagenesis of the ERE at position -900 was performed by PCR. All constructs were validated using automated sequencing. The list of primers used appears in supplementary Table S1.

Transfection and luciferase reporter assay

Prior to transfection, cells were seeded in phenol red-free DMEM medium supplemented with 5% charcoal dextran-treated serum. MCF-7 and 293 cells were transfected by calcium phosphate precipitation as described [60], whereas TOV21G cells were transfected using GeneJuice transfection reagent according to the manufacturer's instruction (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). Typically, cells were transfected with 250ng of luciferase reporter, 10-50ng of pCMX-hER α or pCMX-hER β , and 100ng β -gal construct per well and then treated with vehicle or 10 nM E2 for 16h. Cells are then harvested in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100 and lysates analyzed for luciferase activity using a plate reader (Perkin-Elmer). Luciferase values are normalized for transfection efficiency to β -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared with controls. Luciferase assays are performed in duplicates from at least three independent experiments.

RNA extraction and qPCR analysis

Total RNA was isolated using a commercial kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instruction and cDNA was prepared using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Mississauga, ON). Quantitative PCR amplification was performed as described [61] using a MX3000P cycler (Agilent, Santa-Clara, CA). Relative expression values were normalized to RPLP0 or β -actin and compared to control samples. Each analysis was

performed in duplicates and results are derived from at least three independent experiments. Primer sequences are listed in supplementary Table S1.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

MCF-7 cells were grown to 70-80% confluence and serum-deprived in phenol red-free DMEM/F-12 medium before treatment with vehicle (control), 10nM E2, 100nM 4-OHT or 100nM ICI 182,780 for 45 min. Chromatin was harvested and ChIP and qPCR was performed as described [59, 62]. Primer sequences are listed in supplementary Table S1. Each analysis was performed in duplicates and results are derived from at least four independent ChIP experiments.

Western analysis

Western analysis was carried out in MCF-7 and BT-474 cells, and in ER α - and ER β -231 stable clones treated as above and compared to vehicle (control) treatment. Cells were then harvested as described [59] and immunoblotting was performed using antibodies to HYAL1 (GeneTex, Irvine, CA) and ER α (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA). In each experiment, total protein loading was normalized using an anti- β -actin antibody (Novus Biologicals, Oakville, ON).

ChIP-Seq analysis

The ChIP-seq data were generated as follow: after trimming [63], the sequenced reads were aligned against the human reference genome hg19 using BWA [64], then peaks were called

by MACS [65] using default parameters. Aligned tags were converted to Bedgraph files by HOMER [66] and UCSC, and visualized with IGV [67]. ER α ChIP-seq data were downloaded from [68], while H3K27ac ChIP-seq was generated as described [69].

Cell lysates and Immunoblotting analysis

Immunoblotting procedures were done essentially as described [59, 62]. Briefly, cells were washed in ice-cold PBS and lysed in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Triton X-100, 1 mM orthovanadate, 1 mM NaF, 0.1 mM PMSF, and protease inhibitors (Roche, Laval, QC). Lysate samples (20-30 μ g protein) were then resolved by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose. Membranes were blocked with blocking reagent (Roche) or with 5% dehydrated skim milk in TBS, probed with selected antibodies at 4°C, and incubated with appropriate horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies. Signals were captured by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer, Boston, MA) and analyzed using a LAS 4000 imaging system (GE Life Science, Mississauga, ON).

METABRIC gene expression data

Gene microarray expression (Affymetrix U133) for HYAL1, HYAL2, HYAL3, ESR1, ESR2, SEMA3B and SEMA3F were directly downloaded from the cBioportal for Cancer Genomics website (www.cbiopal.org) using the METABRIC breast cancer dataset [25-27]. Gene expression is normalized to the distribution of each gene in tumors and is annotated as z-scores. Breast cancer subtypes of each tumor sample, classified by the PAM50 assay [28, 29], were also downloaded from the cBioportal website. Graph Pad Prism

6 was used to perform Pearson correlation test (two-tailed) and significance was set at $P < 0.05$.

Acknowledgment

We wish to thank Véronique Caron for expert technical assistance and members of the A.T. laboratory for critical reading and useful comments. L.E. has been supported by doctoral awards from the Réseau Québécois en Reproduction (RQR), the Fondation du CHU Ste-Justine (FCHUSJ), the Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) de l’Université de Montréal, and the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQS). S.B. is supported by the FCHUSJ and the FESP. H.F. is supported by the Michèle St-Pierre - Institut du cancer de Montréal Research Fund. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), and the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (to A.T.).

References

1. Csoka AB, Frost GI and Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology.* 2001; 20(8):499-508.
2. McAtee CO, Barycki JJ and Simpson MA. Emerging roles for hyaluronidase in cancer metastasis and therapy. *Adv Cancer Res.* 2014; 123:1-34.
3. Sironen RK, Tammi M, Tammi R, Auvinen PK, Anttila M and Kosma VM. Hyaluronan in human malignancies. *Exp Cell Res.* 2011; 317(4):383-391.
4. Bourguignon V and Flamion B. Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover. *FASEB J.* 2016; 30(6):2108-2114.
5. Imundo L, Leduc CA, Guha S, Brown M, Perino G, Gushulak L, Triggs-Raine B and Chung WK. A complete deficiency of Hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1) presenting as familial juvenile idiopathic arthritis. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34(5):1013-1022.
6. Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA and Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(11):6296-6300.
7. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, Nadji M and Lokeshwar BL. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001; 276(15):11922-11932.
8. Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P and Lokeshwar VB. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer.* 2003; 106(3):438-445.
9. Lokeshwar VB, Cerwinka WH and Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2005; 65(6):2243-2250.
10. Nykopp TK, Rilla K, Sironen R, Tammi MI, Tammi RH, Hamalainen K, Heikkinen AM, Komulainen M, Kosma VM and Anttila M. Expression of hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in serous ovarian carcinomas: inverse correlation between HYAL1 and hyaluronan content. *BMC Cancer.* 2009; 9:143.
11. Nykopp TK, Rilla K, Tammi MI, Tammi RH, Sironen R, Hamalainen K, Kosma VM, Heinonen S and Anttila M. Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer.* 2010; 10:512.
12. Paiva P, Van Damme MP, Tellbach M, Jones RL, Jobling T and Salamonsen LA. Expression patterns of hyaluronan, hyaluronan synthases and hyaluronidases indicate a role for hyaluronan in the progression of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2005; 98(2):193-202.
13. Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sall T and Mitelman F. Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Res.* 2003; 63(12):3378-3385.
14. Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, Ermilova V, Kazubskaya T, Garkavtseva R, Zabarovska VI, Kashuba VI, Kisseelev LL, Minna JD,

- Lerman MI, Klein G, Braga EA, et al. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene*. 2004; 23(34):5719-5728.
15. Birch AH, Arcand SL, Oros KK, Rahimi K, Watters AK, Provencher D, Greenwood CM, Mes-Masson AM and Tonin PN. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PLoS One*. 2011; 6(12):e28250.
 16. Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Heinonen S, Juhola M, Helisalmi S, Kataja V and Mannermaa A. Frequent gene dosage alterations in stromal cells of epithelial ovarian carcinomas. *Int J Cancer*. 2006; 119(6):1345-1353.
 17. Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, Tremblay A, Provencher DM, Mes-Masson AM and Carmona E. Subtype specific elevated expression of hyaluronidase-1 (HYAL-1) in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2011; 6(6):e20705.
 18. Heldin P, Basu K, Olofsson B, Porsch H, Kozlova I and Kahata K. Dereulation of hyaluronan synthesis, degradation and binding promotes breast cancer. *J Biochem*. 2013; 154(5):395-408.
 19. Victor R, Chauzy C, Girard N, Gioanni J, d'Anjou J, Stora De Novion H and Delpech B. Human breast-cancer metastasis formation in a nude-mouse model: studies of hyaluronidase, hyaluronan and hyaluronan-binding sites in metastatic cells. *Int J Cancer*. 1999; 82(1):77-83.
 20. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, Zheng K and Ren GS. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer*. 2011; 128(6):1303-1315.
 21. Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L and Ren GS. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One*. 2011; 6(7):e22836.
 22. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83(6):835-839.
 23. Wang XY, Tan JX, Vasse M, Delpech B and Ren GS. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation promotion in ER (-) and ER (+) breast cancer cell lines in vitro. *Chin Med J (Engl)*. 2009; 122(11):1300-1304.
 24. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL and O'Malley BW. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(5):1858-1862.
 25. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012; 486(7403):346-352.
 26. Dawson SJ, Rueda OM, Aparicio S and Caldas C. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J*. 2013; 32(5):617-628.
 27. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HK, Provenzano E, Bardwell HA, Pugh M, Jones L, Russell R, Sammut SJ, Tsui DW, Liu B, Dawson SJ, Abraham J, Northen H, Peden JF, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016; 7:11479.

28. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 2009; 27(8):1160-1167.
29. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, Davies SR, Snider J, Stijleman IJ, Reed J, Cheang MC, Mardis ER, Perou CM, Bernard PS and Ellis MJ. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(21):5222-5232.
30. Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP and Akslen LA. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(4):1168-1174.
31. Wu J and Crowe DL. The histone methyltransferase EZH2 promotes mammary stem and luminal progenitor cell expansion, metastasis and inhibits estrogen receptor-positive cellular differentiation in a model of basal breast cancer. *Oncol Rep.* 2015; 34(1):455-460.
32. Safe S and Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2008; 41(5):263-275.
33. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM and Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009; 69(9):3802-3809.
34. Dumitrescu RG. DNA methylation and histone modifications in breast cancer. *Methods Mol Biol.* 2012; 863:35-45.
35. Gong Y, Huo L, Liu P, Sneige N, Sun X, Ueno NT, Lucci A, Buchholz TA, Valero V and Cristofanilli M. Polycomb group protein EZH2 is frequently expressed in inflammatory breast cancer and is predictive of worse clinical outcome. *Cancer.* 2011; 117(24):5476-5484.
36. Holm K, Grabau D, Lovgren K, Aradottir S, Gruvberger-Saal S, Howlin J, Saal LH, Ethier SP, Bendahl PO, Stal O, Malmstrom P, Ferno M, Ryden L, Hegardt C, Borg A and Ringner M. Global H3K27 trimethylation and EZH2 abundance in breast tumor subtypes. *Mol Oncol.* 2012; 6(5):494-506.
37. Reijm EA, Timmermans AM, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Stobbe CK, van Deurzen CH, Martens JW, Sleijfer S, Foekens JA, Berns PM and Jansen MP. High protein expression of EZH2 is related to unfavorable outcome to tamoxifen in metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(11):2185-2190.
38. Yamaguchi H and Hung MC. Regulation and Role of EZH2 in Cancer. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association.* 2014; 46(3):209-222.
39. Tomizawa Y, Sekido Y, Kondo M, Gao B, Yokota J, Roche J, Drabkin H, Lerman MI, Gazdar AF and Minna JD. Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(24):13954-13959.

40. Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C and Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* 2002; 62(9):2637-2643.
41. Joseph D, Ho SM and Syed V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(2):499-509.
42. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Perrotti LI and Mandal SS. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J Mol Biol.* 2014; 426(20):3426-3441.
43. Garcia-Bassets I, Kwon YS, Telese F, Prefontaine GG, Hutt KR, Cheng CS, Ju BG, Ohgi KA, Wang J, Escoubet-Lozach L, Rose DW, Glass CK, Fu XD and Rosenfeld MG. Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell.* 2007; 128(3):505-518.
44. Svetelis A, Bianco S, Madore J, Huppe G, Nordell-Markovits A, Mes-Masson AM and Gevry N. H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ERalpha ligand dependency. *EMBO J.* 2011; 30(19):3947-3961.
45. Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, Sun L, Zhang Y, Chen Y, Li R, Zhang Y, Hong M and Shang Y. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007; 27(14):5105-5119.
46. Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, Fregien N, Dhir N, Scherer S, Klumpp DJ, Manoharan M, Soloway MS and Lokeshwar BL. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem.* 2008; 283(43):29215-29227.
47. Higgins KJ, Liu S, Abdelrahim M, Vanderlaag K, Liu X, Porter W, Metz R and Safe S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Mol Endocrinol.* 2008; 22(2):388-402.
48. Karmakar S, Foster EA and Smith CL. Estradiol downregulation of the tumor suppressor gene BTG2 requires estrogen receptor-alpha and the REA corepressor. *Int J Cancer.* 2009; 124(8):1841-1851.
49. Hao H, d'Alincourt-Salazar M, Kelley KM, Shatnawi A, Mukherjee S, Shah YM and Ratnam M. Estrogen-induced and TAFII30-mediated gene repression by direct recruitment of the estrogen receptor and co-repressors to the core promoter and its reversal by tamoxifen. *Oncogene.* 2007; 26(57):7872-7884.
50. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet.* 2006; 38(11):1289-1297.
51. Welboren WJ, van Driel MA, Janssen-Megens EM, van Heeringen SJ, Sweep FC, Span PN and Stunnenberg HG. ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J.* 2009; 28(10):1418-1428.

52. Parisi F, Sonderegger B, Wirapati P, Delorenzi M and Naef F. Relationship between estrogen receptor alpha location and gene induction reveals the importance of downstream sites and cofactors. *BMC Genomics*. 2009; 10:381.
53. Oesterreich S, Deng W, Jiang S, Cui X, Ivanova M, Schiff R, Kang K, Hadsell DL, Behrens J and Lee AV. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63(17):5203-5208.
54. Stossi F, Likhite VS, Katzenellenbogen JA and Katzenellenbogen BS. Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem*. 2006; 281(24):16272-16278.
55. Suzuki A, Sanda N, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, Murate T, Saito H and Kojima T. Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ERalpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J Biol Chem*. 2010; 285(18):13444-13453.
56. Sanchez M and Tremblay A. Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. *Molecular Genetics of Cancer*. 2005; 5:149-185.
57. Sanchez M, Picard N, Sauve K and Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21(2):104-110.
58. Wu M, Cao M, He Y, Liu Y, Yang C, Du Y, Wang W and Gao F. A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *FASEB J*. 2015; 29(4):1290-1298.
59. Sanchez M, Picard N, Sauve K and Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene*. 2013; 32(1):117-126.
60. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M and Tremblay A. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol*. 2012; 32(14):2709-2721.
61. Demers A, Caron V, Rodrigue-Way A, Wahli W, Ong H and Tremblay A. A Concerted Kinase Interplay Identifies PPARgamma as a Molecular Target of Ghrelin Signaling in Macrophages. *PLoS One*. 2009; 4(11):e7728.
62. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N and Tremblay A. Positive Feedback Activation of Estrogen Receptors by the CXCL12-CXCR4 Pathway. *Cancer Res*. 2009; 69(14):5793-5800.
63. Bolger AM, Lohse M and Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114-2120.
64. Li H and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754-1760.
65. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W and Liu XS. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008; 9(9):R137.
66. Heinz S, Benner C, Spann N, Bertolino E, Lin YC, Laslo P, Cheng JX, Murre C, Singh H and Glass CK. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell*. 2010; 38(4):576-589.

67. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G and Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011; 29(1):24-26.
68. Schmidt D, Schwalie PC, Ross-Innes CS, Hurtado A, Brown GD, Carroll JS, Fliceck P and Odom DT. A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome Res.* 2010; 20(5):578-588.
69. Brunelle M, Nordell Markovits A, Rodrigue S, Lupien M, Jacques PE and Gevry N. The histone variant H2A.Z is an important regulator of enhancer activity. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(20):9742-9756.

Figure legends

Figure 1. HYAL1 expression is downregulated by estrogen in breast cancer cells. (A)

Hyalinase 1 (HYAL1) expression was measured by qPCR in MCF-7 and BT-474 breast cancer cells treated with vehicle (-), 10nM estradiol (E2), 100nM 4-hydroxytamoxifen (OHT) or 100nM ICI 182,780 for 16h. TFF1 and GREB1 are known estrogen-induced genes. Results were normalized with RPLP0 expression and expressed as fold response compared to vehicle-treated cells set at 1.0. *, P < 0.05; **, P < 0.005. (B) Western analysis of HYAL1 and ER α in MCF-7 and BT-474 cells treated as in (A).

Figure 2. Regulation of the 3p21.3 locus by estrogen and antiestrogens. (A)

Representation of the genes contained in the 3p21.3 locus using IGV. (B) qPCR analysis of genes located in the vicinity of HYAL1 in the 3p21.3 locus. MCF-7 cells were treated with 10nM E2, 100nM OHT, or 100nM ICI 182,780 for 16h and results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to vehicle-treated cells set at 1.0. *, P < 0.05; **, P < 0.005.

Figure 3. ER α but not ER β mediates HYAL1 down-regulation in breast cancer cells.

(A) MCF-7 cells were treated with selective agonist propylpyrazole-triol (PPT) for ER α or diarylpropionitrile (DPN) for ER β for 16hrs and HYAL1 expression was analyzed by qPCR. Results were normalized to RPLP0 expression and are expressed as fold response compared to vehicle-treated cells set at 1.0. (B) ER α and ER β stable clones were generated from

parental ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells and treated or not with 10nM estradiol (E2) for 16hrs. qPCR analysis was performed and results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to vehicle-treated cells set at 1.0. **(C)** ER α decrease of HYAL1 protein levels. Western analysis in ER stably expressed 231 clones treated as in B. Control loading was normalized to β -actin. *, P < 0.05.

Figure 4. Inverse correlation of HYAL1 and ESR1 expression in breast cancer tissues.

(A) Mean values of HYAL1 (white bars) and ESR1 (black bars) gene expression, from normalized z-scores of the METABRIC dataset, were plotted according to PAM50 breast cancer subtype stratification. **(B-G)** Pearson correlation analyses was performed between HYAL1 and ESR1 gene expression (z-scores) in breast cancer tumors from the whole METABRIC cohort (n=1980) **(B)**, or from luminal A (n=781) **(C)**, luminal B (n=488) **(D)**, normal-like (n=199) **(E)**, basal-like (n=329) **(F)** and HER2-enriched (n=240) **(G)** breast tumor subtypes. In each case, Pearson scores and P values are indicated.

Figure 5. ER α binding analysis at the 3p21.3 locus. (A) UCSC genome view of ER α and H3K27ac enrichment at the 3p21.3 locus as determined by ChIP-seq analysis in MCF-7 cells. Peaks were mapped from cells treated with vehicle and 10nM estradiol for 45min, and aligned on the reference genome hg19. **(B)** ChIP-qPCR validation of ER α binding sites identified from ChIP-seq analysis in vicinity of the HYAL1 gene. Positions of the estrogen response elements (ERE) are indicated relative to the transcriptional start site of the HYAL1

gene. MCF-7 cells were treated with 10nM E2, 100nM OHT, or 100nM ICI 182,780 for 45min. **(C)** ChIP-qPCR mapping of repressive histone H3K27me3 mark relative to ER α binding sites analyzed in (B). Cells were treated as in (B).

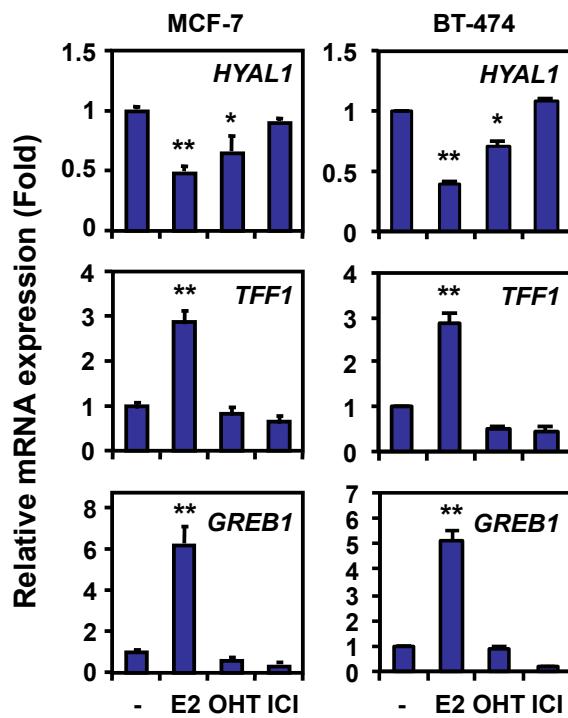
Figure 6. ER α enrichment at Sp1 binding sites of the HYAL1 promoter. **(A)** ChIP of ER α was performed at Sp1 binding sites located in the proximal promoter of HYAL1 in MCF-7 cells treated or not with 10nM E2, 100nM OHT, or 100nM ICI 182,780 for 45min. PCR was done with primers encompassing the proximal (-60) and distal (-1020) Sp1 binding sites relative to the transcriptional start site of the HYAL1 gene. **(B)** Mapping of H3K27me3 repressive mark to the Sp1 sites of HYAL1. MCF-7 cells were treated as in (A).

Figure 7. Regulation of the proximal promoter activity of HYAL1 by ER α . **(A)** 293 cells were transfected with ER α or ER β in the presence of a luciferase reporter construct containing the proximal P1 promoter of HYAL1. Cells were then treated or not with 10nM estradiol (E2) for 16h. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared to vehicle-treated mock transfected cells set at 1.0. **(B)** Truncated regions of the HYAL1 proximal P1 promoter were analyzed for estrogen responsiveness in luciferase reporter assays as in (A) in response to ER α expression. The ERE-900 was also mutated (mERE) in the context of the P1 fragment. Cells were treated or not with 10nM estradiol (E2) for 16h. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as relative fold response compared to vehicle-treated controls set at

1.0. **(C)** HYAL1 wild-type or mERE P1 promoter activity was determined in MCF-7 cells treated with 10nM E2 or vehicle for 16h. Cells were analyzed for luciferase activity as in (A). **(D)** Same as in (C) except that ovarian cancer TOV21G cells were used. *, P < 0.05.

Fig. 1

A



B

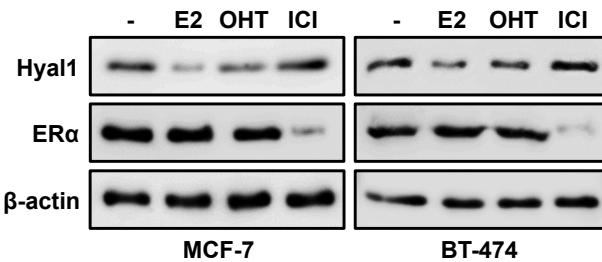
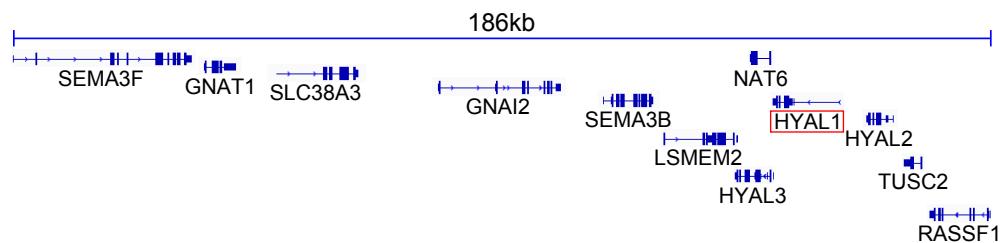


Fig. 2

A



B

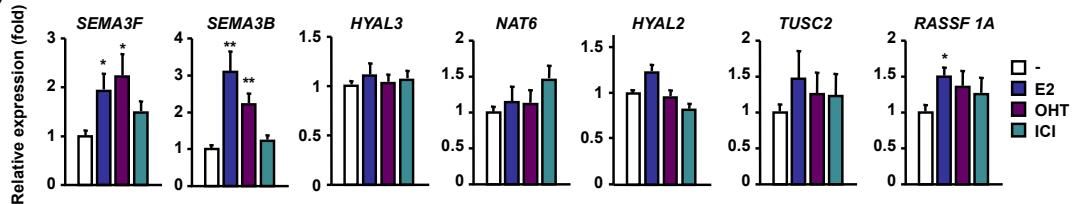


Fig.3

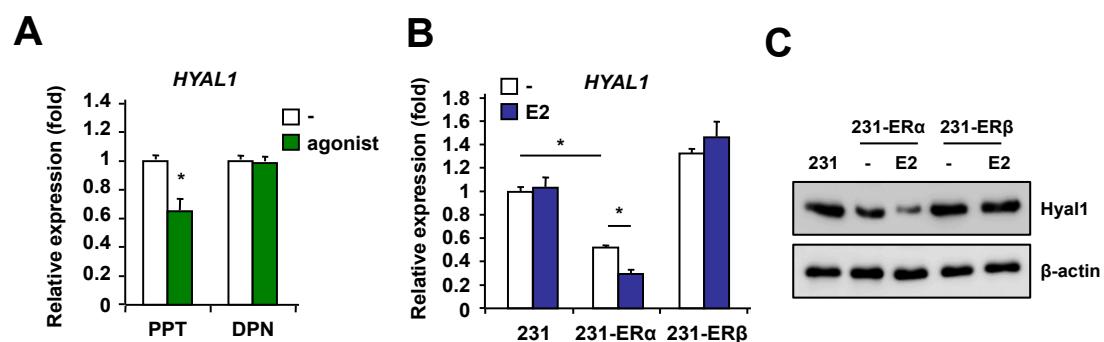


Fig.4

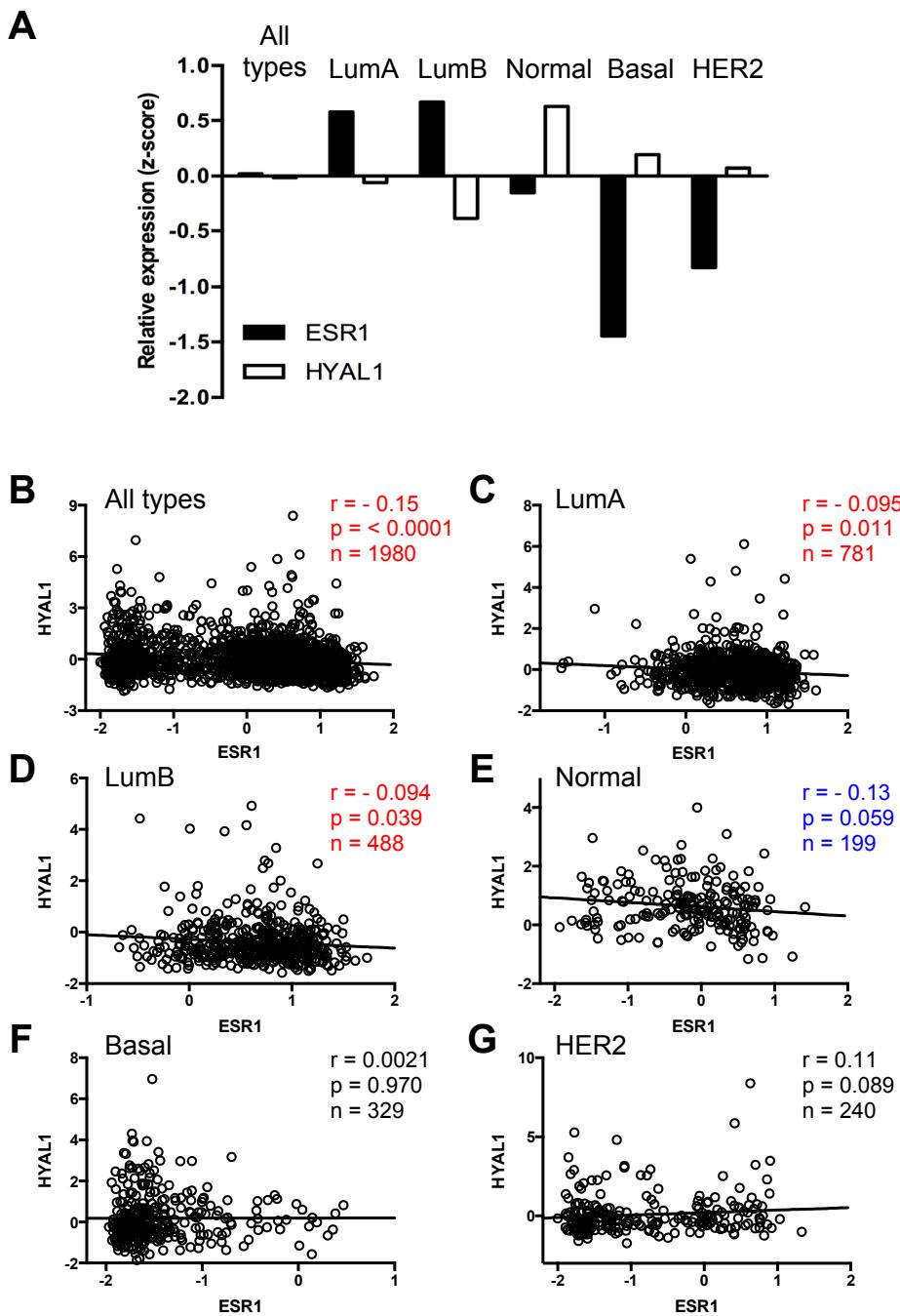
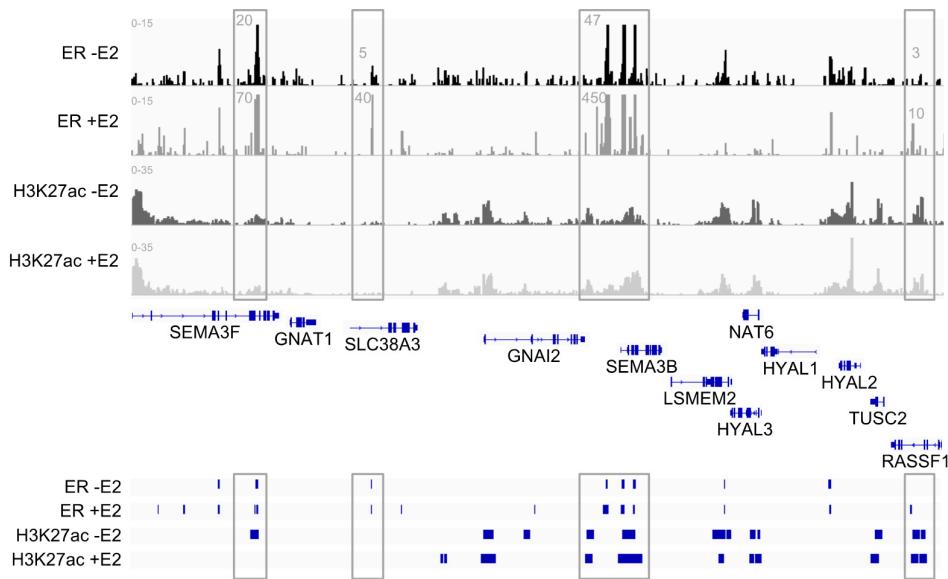
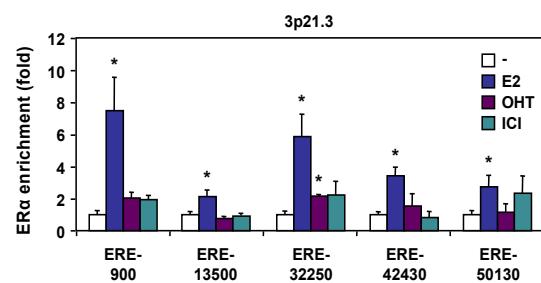


Fig.5

A



B



C

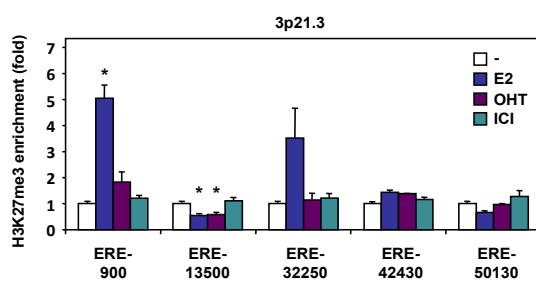


Fig.6

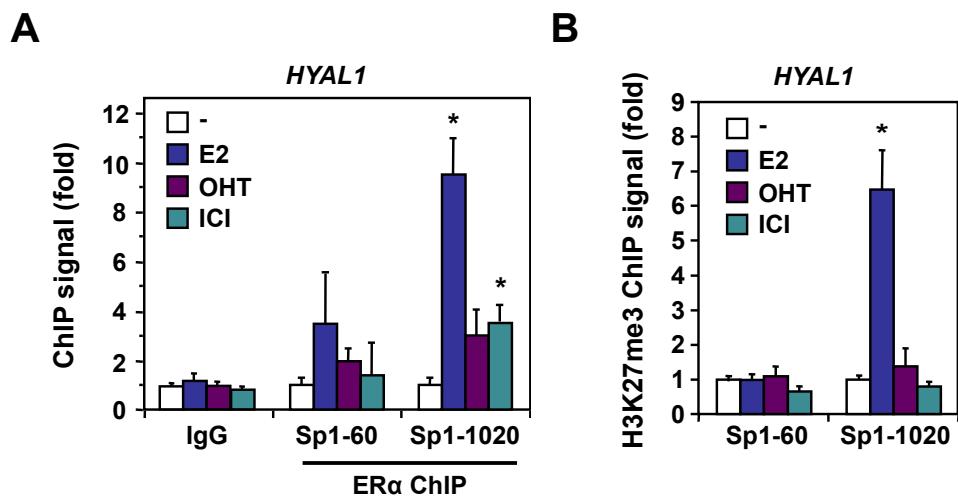


Fig. 7

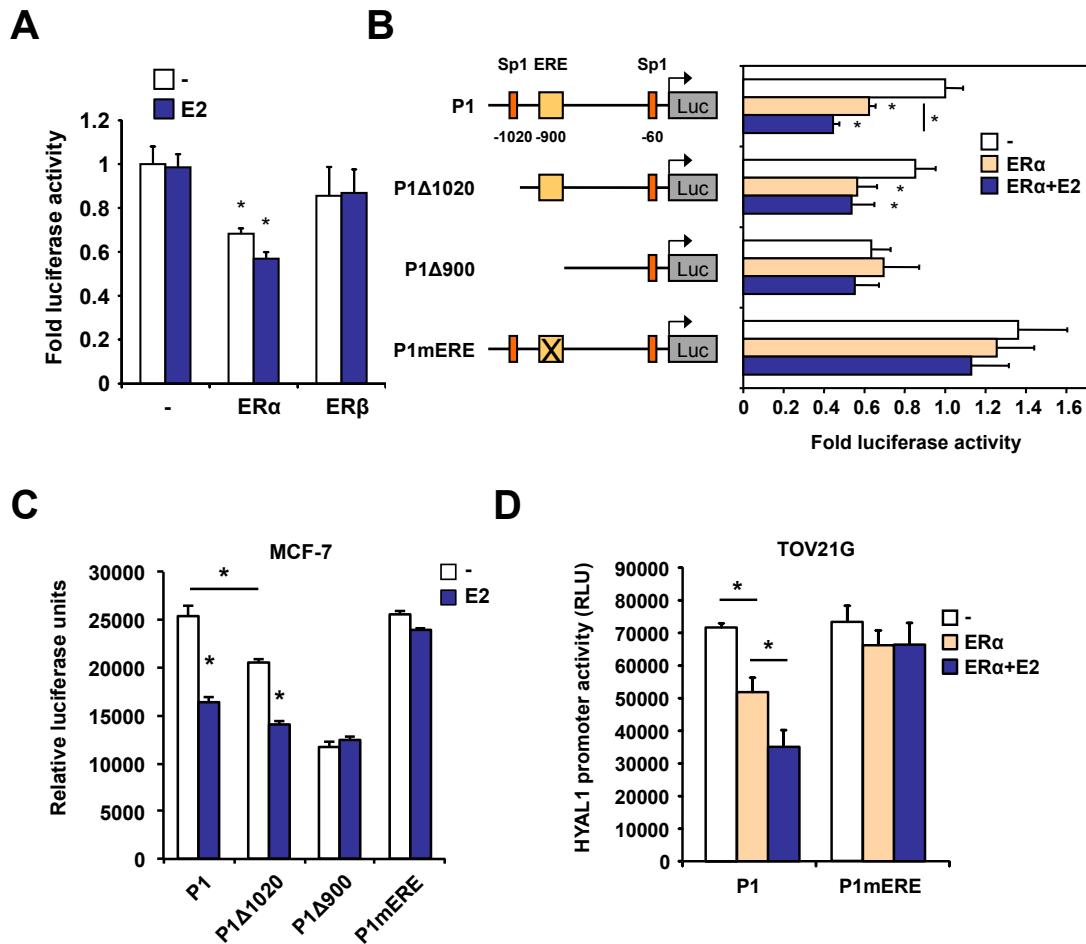


Table 1: Pearson correlation analyses applied to the METABRIC dataset (n=1980 breast cancer patients, whole cohort) for expression between estrogen receptor \square (ESR1) and genes of the 3p21.3 cluster. Also shown is analysis between estrogen receptor \square (ESR2) and HYAL1.

Genes	Pearson r	p value
ESR1 vs HYAL1	-0.15	<0.0001
ESR1 vs HYAL2	0.0045	0.8427
ESR1 vs HYAL3	-0.0065	0.7739
ESR1 vs SEMA3B	0.45	<0.0001
ESR1 vs SEMA3F	0.48	<0.0001
ESR2 vs HYAL1	0.030	0.1847

Fig. S1

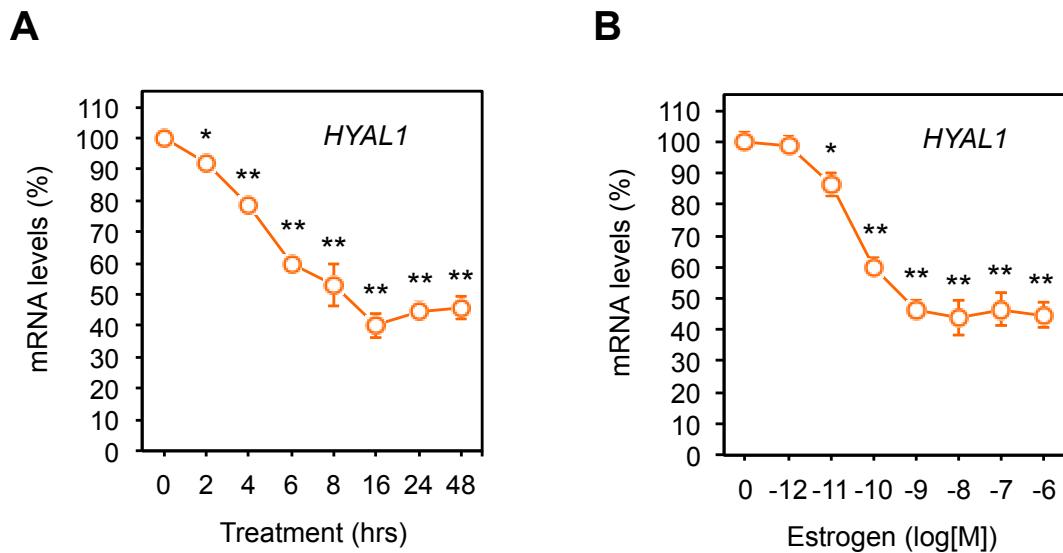


Figure S1. Estrogen regulation of HYAL1 gene in breast cancer cells.

(A) Time-dependent decrease of HYAL1 expression by estrogen. Real-time PCR analysis of HYAL1 expression in human breast cancer MCF-7 cells treated with 10^{-8} M 17 β -estradiol for the indicated time periods. Results were normalized to RPLP0 expression and expressed as % response compared to vehicle-treated cells set at 100. Values represent means \pm SDs derived from three separate experiments performed in triplicates. (B) Similar as in A, except that cells were treated with increasing concentrations of 17 β -estradiol for 16hrs. *, P<0.02; **, P<0.001 vs control cells.

Fig. S2

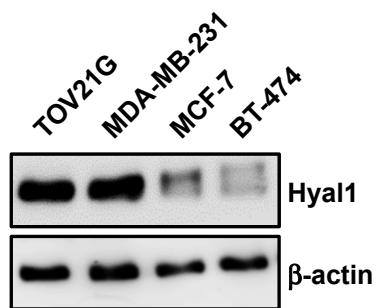


Figure S2. Relative Hyal1 protein expression in breast and ovarian cancer cells.
Western blot analysis of HYAL1 in ER α -positive breast cancer cells (MCF-7 and BT-474) and ER α -negative MDA-MB-231 breast cancer and TOV21G ovarian cancer cells. Total protein loading was normalized using an anti- β -actin antibody.

Fig. S3

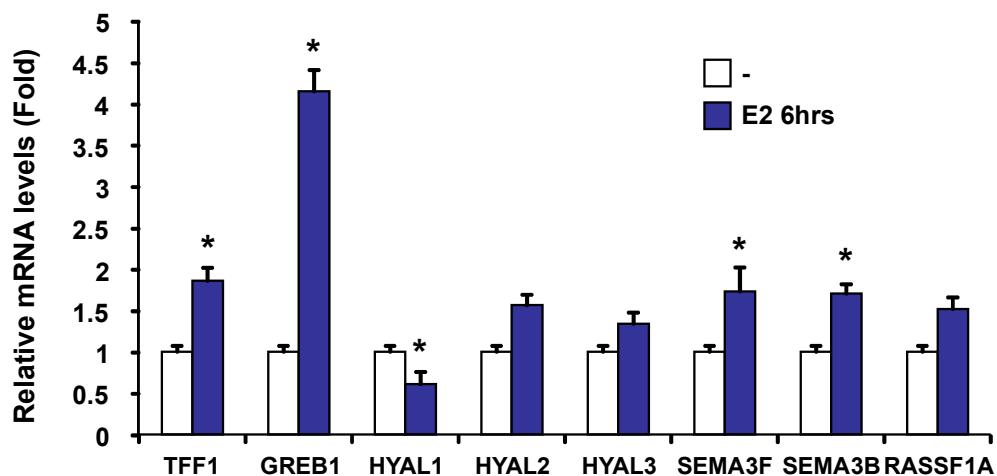
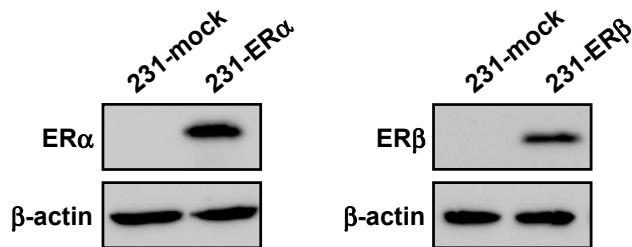


Figure S3. Regulation of the 3p21.3 locus by estrogen.

Real-time PCR analysis of genes located in the 3p21.3 locus. MCF-7 cells were treated with 10nM E2 for 6hrs and results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to vehicle-treated cells set at 1.0. Also represented are estrogen-responsive genes TFF1 and GREB1. *, P < 0.05.

Fig. S4

A



B

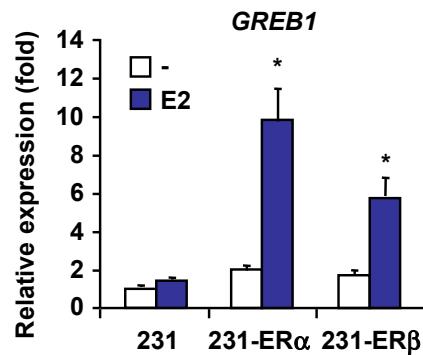


Figure S4. MDA-MB-231 cell lines stably expressing ER α and ER β .

ER-negative human MDA-MB-231 breast cancer cells were transfected with expression vectors for ER α and ER β and resistant clones were selected with neomycin to generate 231-ER α and 231-ER β cell lines. (A) Cells were analyzed for respective ER α (left) and ER β (right) expression by Western blot and compared with mock-transfected control cells. (B) ER target GREB1 gene expression was analyzed by qPCR in 231 stable clones. Cells were treated or not with 10nM estradiol (E2) for 16hrs. Results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to vehicle-treated 231 control cells set at 1.0. *, P < 0.05.

Fig. S5

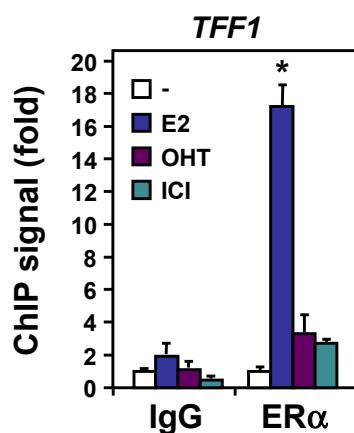


Figure S5. Induction of ER α enrichment to TFF1 gene by estrogen.

Validation of ChIP-qPCR analysis of the ER target gene TFF1 in MCF-7 cells treated with 10nM estradiol, 100nM tamoxifen and 100nM ICI 182,780 for 45min. Results are expressed as fold-enrichment of ER α binding compared to vehicle-treated cells set at 1.0. IgG was used as a negative control. *, P < 0.05.

Fig. S6

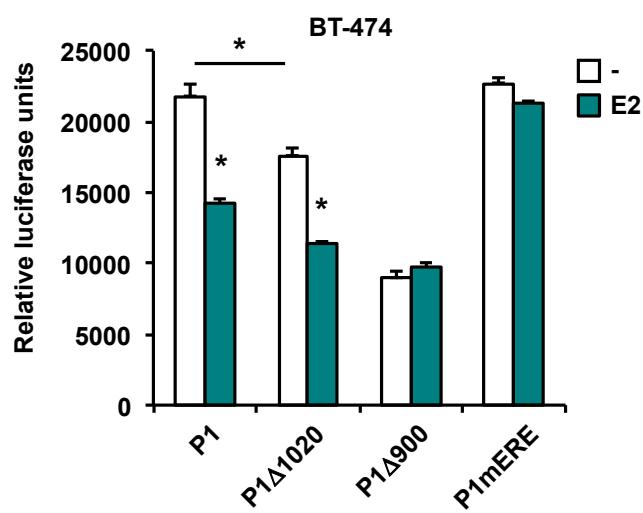


Figure S6. Estrogenic repression of the proximal promoter of HYAL1 in breast cancer cells.

ER α -positive breast cancer BT-474 cells were transfected with luciferase reporter gene under the control of the proximal promoter (P1) of HYAL1 or truncated variants (Δ 900 and Δ 1020). The ERE-900 was also mutated (mERE) in the context of the P1 fragment. Cells were then treated or not with 10nM estradiol (E2) for 16h and harvested for luciferase assay. Luciferase values were normalized to β -galactosidase activity and are expressed as relative luciferase units. *, P < 0.05 vs vehicle-treated cells for each construct.

Table S1: List of primers used

qRT-PCR analysis	
HYAL1	forward 5'-AAGCCCTCCTCCTCCTTAACC-3' reverse 5'-AGCCAGGGTAGCATCGAC-3'
HYAL2	forward 5'-CACCAAGCACGGAGACCT-3' reverse 5'-CAGGCACTAGGCGGAAACTG-3'
HYAL3	forward 5'-TGCTGGCATCTCCATGACTACC-3' reverse 5'-CTTCCATCTGTCCCTGGATCTCG-3'
SEMA3F	forward 5'-CGTGAGGAACCCTGTCATTACGC-3' reverse 5'-CCGTGGGTAGGGCATCTCCCTG-3'
SEMA3B	forward 5'-CCAGCGCAGCCTGGTCAACAAGTG-3' reverse 5'-GGACGTGGAGAAGACGGCATAGAG-3'
RASSF1A	forward 5'-CCGTGGCCACCGCTTCCAGCCC-3' reverse 5'-CCGCAACAGTCCAGGCAGACGAG-3'
TUSC2	forward 5'-TCACCAAGAACGGGCAGAAG-3' reverse 5'-TCATAGAGGATCACAGGGAAATCC-3'
NAT6	forward 5'-ACTTGAAGCAGCACCCGTTG-3' reverse 5'-ACCACCACTGTCTCCACTAAGAGG-3'
TFF1	forward 5'-TGGAGAACAAAGGTGATCTGCG-3' reverse 5'-CGAACACAGCAGCCCTTATTGCG-3'
GREB1	forward 5'-TTCCCCGAAGTGCCAACAAAC-3' reverse 5'-ATGGAGATTCTGGAGACCACCC-3'

Table S1: List of primers used (cont'd)

ChIP-qPCR analysis	
ERE-900	forward 5'-TAACCCAGACATGACCTCCTGG-3' reverse 5'-GGCAATGTAGCAAGACCCCATC-3'
ERE-13500	forward 5'-CCCTGAGGAAAGAAGGAGCAG-3' reverse 5'-GGTGAGTCATCACGGACATGG-3'
ERE-32250	forward 5'-CGGTGGCTCACACCTCTAATG-3' reverse 5'-GCTGACCTCGAATTCTGATTG-3'
ERE-42430	forward 5'-ATAAGGAGGAGGAAGAGGCAGCG-3' reverse 5'-TGCCAATGCCATAGTATTGG-3'
ERE-50130	forward 5'-ACATGGAGGGCAAATCCAG-3' reverse 5'-TGTGCTCACTCTGGTTACTGC-3'
Sp1-60	forward 5'-AACCAAGATCCCTTGCCAG-3' reverse 5'-TCCAAATTCTGACCCCAG-3'
Sp1-1020	forward 5'-CACTAAGCACAATAGACCCAAGGCC-3' reverse 5'-GAGGTATGTCTGGTTACACTATT-3'
HYAL1 promoter	
P1-F	5'-GACACAGTCACTAACCCAGC-3'
P1-Δ 900-F	5'-AGCACAGTGGAGCAGTCTTG-3'
P1-Δ 1020-F	5'-GTGTAACCCAGACATGACC-3'
P1-R	5'-TCCAAATTCTGACCCCAG-3'
MutERE-F	5'-GACTACAGGTACATAAAACCAACCCAGCTAATTT-3'

2^{ième} publication

Hematopoietic factor SCL/TAL1 regulates estrogen receptor signaling in breast cancer cells

Lydia Edjekouane^{1,2}, Samira Benhadjeba^{1,2}, Karine Sauvé^{1,2}, and André Tremblay^{1,2,3,4}

¹Research Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, H3T 1C5 Canada

²Departments of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada

³Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, University of Montreal, Saint Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

⁴Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montréal, Québec, H3T 1J4 Canada.

(In preparation)

Short title: TAL1 in breast cancer

Keywords: Estrogen receptors; Leukemic factor; gynecologic cancers

DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

Address correspondence to: André Tremblay, Research Center, Ste-Justine Hospital, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec), Canada, H3T 1C5. Email: andre.tremblay.1@umontreal.ca.

Contributions des auteurs

Lydia Edjekouane : À titre de premier auteur, en me basant sur les résultats préalables obtenues par une étudiante à la maîtrise, Julie Martin, j'ai mis au point les conditions expérimentales, j'ai réalisé et analysé toutes les expériences présentées. J'ai également écrit la première version de l'article.

Samira Benhadjeba : a participé activement aux discussions et a apporté son aide et expertise à de nombreuses reprises sur les expériences de prolifération et de migration cellulaire (Figure 8A ; B).

Karine Sauvé : a réalisé certaines constructions utilisées dans cet article. Elle a également apporté son aide et expertise à mes débuts au doctorat étant donné qu'elle avait commencé le projet avant mon arrivée au laboratoire.

Dr André Tremblay : En tant que superviseur, le Dr. Tremblay a supervisé et a participé à la conception du projet. Il a également corrigé l'article.

Abstract

In addition of being regulated by the hormone, estrogen receptor activity is also known to be modulated by coregulator proteins. Here, we identified a new unexpected interaction partner for ERs in breast cancer MCF-7 cells, the hematopoietic transcription factor TAL1. Despite its reputation as an oncogene in acute T-cell lymphoblastic leukemia and its crucial role in hematopoiesis, this transcription factor is an ER α -corepressor due to a direct repressive effect on the transcriptional activity of the receptor in response to estrogen and thus to expression of its target genes in breast cancer cells. Moreover, TAL1 also inhibits ER α activation in response to phosphorylation induced by the MAPK/Erk pathway. Repression of ER α activity by TAL1 in response to estrogen involves competition with SRC1 and CBP coactivators for interaction with ER α . Thus, we observe an enrichment in H3K27 methylation and a decrease of the positive mark H3K27ac at ER α target genes in response to E2 without any change in ER α recruitment to promoters. This repression of ER α by TAL1 results in a decreased growth and migration of mammary cancer cells.

Introduction

Estrogens are pivotal to normal reproductive physiology, regulating differentiation and homeostatic aspects of gynaecological tissues and functions, but have also been implicated in the initiation and development of malignancies, such as breast and endometrial cancers (1). Estrogens mediate their effects through binding to estrogen receptor ER α and ER β , members of the nuclear receptor superfamily of hormone-activated transcription factors that modulate gene transcription (2-4). Activated estrogen receptors will adopt a conformational change to allow direct binding to cognate estrogen response elements (EREs) in the genome to activate target gene expression. Such recruitment to chromatin and transcriptional activation involves interaction with a number of coactivators, including the p160/SRC family members and CBP/p300, to bridge with the RNA pol II transcription machinery (5). Also, recruitment of other transcription factors, such as Sp1, NF κ B and AP-1 through tethered interactions with ERs have been reported to regulate estrogenic response (6). Transcriptional corepressors have also been reported for their ability to weaken or impede the agonist effect of estrogens and thus provide a control of ER α activity to restrain estrogen responsiveness (7). Abnormal ER α over-expression is found in 75% of breast cancers and is associated with initiation and progression of tumorigenesis, resulting in an altered activation of proliferative genes and cell cycle regulators (8, 9).

Erythroid cell production is a complex process involving multi-wave sequential dynamics characterized by primitive and definitive hematopoiesis that dictate differentiation and maturation of erythro-myeloid progenitors and hematopoietic stem cells to seed the bone marrow. TAL1 (T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia 1), also known as SCL (Stem Cell

Leukemia), plays a crucial role in the early and late steps of the hematopoiesis process, where it is essential for specification and self-renewal of hematopoietic stem cells, as well as for terminal differentiation of erythrocytes (10-12). TAL1 was first identified by its involvement in a T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)-specific chromosomal translocation, linking TAL1 to leukemic oncogenesis (13-15). It is a class II basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor that regulates transcription of its target genes by binding to a hexanucleotide sequence CANNTG termed the E-box (16). For this, it needs to heterodimerize with ubiquitously expressed class I transcription factors E2A (*i.e.* E12, E47), E2-2 and HEB, also referred to as the E-proteins (17, 18). TAL1 dimers also associate with several binding partners that are important to mediate TAL1 hematopoietic cell growth and differentiation, which includes ETO2, GATA, LDB1 and the non-DNA-binding LIM-only protein LMO2 (19-22). TAL1 can act either as a transcriptional activator or repressor in hematopoietic cells, where it activates transcription by recruiting the histone modifying coactivator proteins CBP/P300 and P/CAF (23, 24), or by interacting with mSin3A, ETO2, HDAC1/2, or lysine-specific demethylase LSD1 for its repressive activity (20, 25-27). Such decision in TAL1 transcriptional fate mostly relies on chromatin context at target genes and complex assembly with readily available cofactors, rendering a permissive or non-permissive micro-environment for transcription. In adults, TAL1 expression is shown to be limited to the endothelial and hematopoietic lineages, such as mastocytes, megakaryocytes and erythrocytes, in contrast to lymphocytes where TAL1 is normally silenced during early thymocyte development (28). In pathology, aberrant T-cell lineage regulation of TAL1 gene by recurrent interstitial chromosomal deletion/translocation has been considered a major cause of childhood T-ALL oncogenesis (29, 30).

In this study, we identified TAL1 as a novel regulator of estrogenic response in breast cancer cells. We show that TAL1 interacts with ER α and ER β , resulting in their transcriptional repression in response to estrogen and to Erk-activated pathways and to reduction of target genes expression and migration potential of breast cancer cells. Whereas its role is well recognized in erythroid lineage diversification and hematopoiesis, these findings point to an unexpected role of TAL1 in breast tumorigenesis.

Materials and methods

Cell culture

Human breast cancer MCF-7, BT474, and MDA-MB-231 cells, breast epithelial MCF-10A cells, ovarian cancer OVCAR-3, TOV21G, and SKOV-3 cells, and endometrial HEC-1A and Ishikawa cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Control (shCtl) and TAL1 depleted (shTAL1) MCF-7 stable cells were also cultured in DMEM with 10% FBS. Human embryonic kidney 293 cells were cultured in DMEM supplemented with 5% FBS. Cells were usually treated with 10nM β -Estradiol (E2) for 16h or else indicated, and compared to vehicle (EtOH)-treated control. Cells were also treated with cAMP activated kinase (PKA) activator forskolin (40 μ M; Cedarlane, ON) and PKA inhibitor H89 (20mM; Sigma, St-Louis, MO).

Plasmid Constructs

Expression pCMX plasmids coding for human ER α and ER β (wild type and serine to alanine mutants), and constitutive oncogene RasV12 mutant, and reporter luciferase constructs ERE-bLuc, pS2-Luc and the ERE lacking pS2-Luc (pS2- Δ ERE-Luc) have been described (31-34). Expression pCMX plasmids coding for human TAL1 (wild type, Δ basic, Δ 1-176, and Δ 60-331) were generated by PCR amplification. Single serine to alanine mutations of TAL1 at Ser-122 and Ser-172 were generated by PCR mutagenesis using the Pwo DNA polymerase (Roche Life Science, Laval, QC). All constructs were verified by automated sequencing.

Transfection and luciferase assay

For transient transfection, cells were seeded in phenol red-free DMEM supplemented with charcoal dextran-treated serum and plasmid constructs were introduced into cells using the calcium phosphate precipitation method. Typically, for luciferase assay, cells were seeded into 24-well plates and transfected when indicated with 500 ng reporter construct, 10–50 ng ER expression plasmids, 100 ng each of TAL1 and/or RasV12 expression plasmids and 250 ng pCMX- β gal. After 5–8 h, medium was changed and cells were treated as indicated. Cells were then harvested in potassium phosphate buffer containing 1% Triton X-100 and lysates analyzed for luciferase activity (Perkin-Elmer) after the addition of luciferin. Luciferase assays were performed in duplicate from at least three independent experiments, and values were expressed as relative light units normalized to the β -galactosidase activity of each sample.

RNA extraction and quantitative PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction and 1 μ g total RNA was treated with RNase-free DNase and reverse-transcribed using RevertAidTM RT Kit (Thermo Fisher Scientific, CA). Quantitative PCR amplification was performed as described (35) using a QuantStudio[®] 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, CA). Quantitative amplifications were obtained using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, CA) and relative expression values were normalized to RPLP0 and compared to control samples. Each analysis was performed in duplicates and results are derived from at least three independent experiments.

Cell lysates, co-immunoprecipitation, and immunoblotting

TAL1 recruitment to ER α and ER β was determined by co-immunoprecipitation using HA epitope-tagged TAL1 and ER expression plasmids in transfected 293 cells. Cell lysates were immunoprecipitated using specific antibodies to ER α and ER β (Santa Cruz Biotech, CA; Cell Signaling Technology, CA), and Western blot analysis was performed with an anti-HA antibody (12CA5). Signals were revealed by chemiluminescence using appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Coimmunoprecipitation in MCF-7 cells was performed similarly except that specific TAL1 antibody (GenTex Inc., TX) was used.

RNA interference

To deplete TAL1 expression, small hairpin RNA (shRNA) duplexes targeting the sequence TGGAGGGGATCAGTATATAACA of human TAL1 (shTAL1) were inserted into a lentiviral vector and viral particles were produced in 293T cells as described (27). Parental MCF-7 cells were then infected and compared to shCtl control cells. TAL1 efficient knockdown was monitored by qPCR and Western blot analysis.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assay were carried out essentially as described (36). shCtl and shTAL1 stably expressing MCF-7 cells were treated or not with 10 nM E2 for 45 min and chromatin was immunoprecipitated using antibodies to ER α (Santa Cruz Biotech, CA), histone H3K27me3 and H3K27ac marks (Abcam, Cambridge, MA) or TAL1 (GenTex, TX). The DNA pellets were

recovered and analyzed by qPCR using primer pairs that encompass the EREs of the indicated gene promoters. The fold enrichment was determined by calculating the ratio of the amount of the target sequence in the immunoprecipitation over the amount of the target sequence in the input DNA, using the following formula: $1/2^{CT \text{ Input} - CT \text{ sample}}$, where CT is the number of cycles needed to raise the threshold. Each analysis was performed in duplicate and results are derived from at least four independent ChIP experiments.

Cell growth assay

shCtl and shTAL1 MCF-7 stable cells (10^5 per well) were maintained in DMEM containing 1% FBS and treated or not with 10 nM E2 over a period of 72h with freshly added medium change every 24h. Cell growth was monitored by impedance using the xCELLigence system (ACEA Bioscience, Inc.) and expressed as relative cell proliferation according to the CI (cell index) value provided by the RTCA software. Each analysis was carried out in duplicate and results are derived from at least three independent experiments.

Cell wound healing assay

Cells were seeded in a 6 well plates until they reached ~80% confluency and a single stripe (~300 μm wide) was scraped on the cell-coated surface with a 10 μl pipette tip. Cells were then washed with PBS to remove floating debris and fresh DMEM supplemented with 2% FBS was added in absence or presence of 10 nM E2. The healing of the scratch wound was monitored at different time points (0, 24, 48 and 72 h) by taking bright field images (Zeiss Axio Imager, ZEISS, CA) and the average extent of wound closure was determined by measuring the width

of the migratory distance of cells using the NIH Image J software. Results are derived from three independent experiments.

Results

Erythroid transcription factor SCL/Tal1 is expressed in reproductive cancer cells and is a novel interaction partner of estrogen receptors ER α and ER β

Our initial work has demonstrated that increased Erk-targeting of ER α and ER β results into estrogen-like effects in hormone-responsive tissues (34, 36, 37). This emphasizes a prominent role of receptor activation function AF-1 phosphorylation to sustain ER transcription competence in conjunction or not with hormone, and provides a possible route to induce undesired cell growth in gynecologic cancers. In an attempt to identify putative AF-1 phosphorylation-dependent cofactors that might disrupt ER α /ER β regulation, we have identified SCL/TAL1 by interaction screening using phosphorylated ER β as a bait (Fig. 1A). This finding was unexpected since TAL1 is better known as a leukemic bHLH transcription factor primarily expressed in erythroid progenitors and acting as a master regulator of hematopoiesis (12, 38). We thus determined the expression profile of TAL1 in a subset of reproductive cancer cells and found high levels of TAL1 transcripts in human ovarian cancer OVCAR-3 cells and in breast cancer MCF-7 and BT474 cells, and to a lesser extent in endometrial cancer Ishikawa cells (Fig. 1B). Interestingly, these cells are considered ER-positive, while cells identified as ER-negative, such as MCF-10A and TOV21G cells, do exhibit very poor expression of TAL1. To further validate at the protein levels, Western analysis shows strong levels of the long p42 form of TAL1 in OVCAR-3, BT474 and MCF-7 cells, and undetectable levels in MCF-10A and HEC-1A cells, correlating with gene expression data (Fig. 1C). Of interest is the preferred expression of the p22 short form in Ishikawa and TOV21G cells, suggesting that post-translational processing of TAL1 might occur in a cell-dependent context.

TAL1 as a novel regulator of estrogen receptors ER α and ER β in breast cancer cells.

We thus validated the phosphorylation-dependent interaction of TAL1 with the estrogen receptors by co-immunoprecipitation using transfected cells. We found that ectopic expression of TAL1 in human 293 cells resulted in an increased recruitment to ER α (Fig. 2A) and ER β (Fig. 2B) under basal conditions, and further promoted in the presence of oncogene Ras^{V12}, a constitutive variant that strongly activates the MAPK/Erk pathway. However, TAL1 was less recruited to ER α in presence of estrogen and potentiation of TAL1-ER α recruitment by Ras^{V12} was also reduced by hormone (Fig. 2C). Similar results were obtained in breast cancer MCF-7 cells, in which recruitment of TAL1 to ER α was enhanced by Ras^{V12}, while decreased by estrogen (Fig. 2D).

The functional significance of TAL1 on ER α transcriptional activity was determined by luciferase reporter assay. Activation levels of ER α in response to estrogen and Ras^{V12} were significantly reduced upon TAL1 over-expression in transfected 293 cells (Fig. 2E). Similar inhibition by TAL1 was also observed on the additive response to estrogen and Ras^{V12}. We then generated stable shTAL1-expressing cells using parental MCF-7 cells (shTAL1-MCF-7) to knockdown endogenous TAL1 expression. Consistent with results obtained with TAL1 ectopic expression, the shTAL1-MCF-7 cells exhibit a greater ER-mediated response to estrogen and to Ras^{V12} compared to shCtl-MCF-7 control cells (Fig. 2F). These results identify TAL1 as a cofactor of ER transcriptional potential in breast cancer cells.

TAL1 DNA binding is not required for ER α recruitment

We next determined which domain of TAL1 is required to mediate the interaction with ER α . Truncation of the N-terminal aa1-176 region of TAL1 severely impaired the recruitment of ER α ,

indicating this region to be essential in promoting ER α recruitment in response to Ras^{V12} (Fig. 3A). Interestingly, removal of the basic domain (Δ basic) of TAL1, which mediates E-box binding, had no significant effect on the interaction with ER α (Fig. 3A) and on the ability to downregulate transcriptional response of ER α to Ras^{V12} (Fig. 3B). It is known that TAL1 can act either as a transcriptional factor by binding the E-box on promoters of target genes, such as the P4.2 promoter in murine erythroleukemia cells (39), or as a cofactor where the DNA-binding activity of TAL1 is not required (40). Our results indicate that DNA binding of TAL1 is not required to promote ER α recruitment and inhibition, therefore identifying TAL1 as a cofactor of ER α .

Serine 172 of TAL1 is essential to mediate recruitment and repression of ER α to oncogenic Ras

We found that the truncated deletions Δ 1-176 and Δ 60-331 completely abolished TAL1 repressive effect on ER α , suggesting that the region encompassing aa 60-176 is critical to oncogenic Ras response (Fig. 3B). Interestingly, this region contains Ser-122 and Ser-172, two sites reported to be phosphorylated by Erk1 and PKA respectively (26, 41). We thus generated serine to alanine mutants at these positions and found that disruption of Ser-172 strongly impaired the Ras-dependent recruitment of TAL1 to ER α compared to wild type TAL1, whereas the S122A mutation had no effect (Fig. 4A). Likewise, the S172A mutation abolished the inhibition of ER α activity to TAL1, whereas the S122A had no effect (Fig. 4B). These results suggest a critical role of Ser-172 in the repressive effect of TAL1 on ER α .

PKA induction of TAL1-ER α interaction requires Ser-172

We next addressed whether phosphorylation of Ser-172 serves as a recruiting signal for ER α interaction. Based on previous observation that Ser-172 is a consensus site for PKA (27, 41), we treated cells with the PKA activator forskolin and observed a time-dependent increase in TAL1 recruitment to ER α compared to untreated cells (Fig. 5A). Addition of the PKA inhibitor H89 to cells strongly impaired the effect of forskolin (Fig. 5A) and of oncogenic Ras (Fig. 5B) on TAL1 recruitment to ER α , consistent with a role for PKA to induce TAL1-ER α interaction. The effect of forskolin was also tested in the context of TAL1 serine mutants where ER α recruitment was severely disrupted with the S172A mutant, compared to the S122A and wild type TAL1 (Fig. 5C). These results identify PKA as a signaling effector in the interaction of TAL1 with ER α and suggest Ser-172 as a target for phosphorylation.

TAL1 regulates the expression of estrogen responsive genes in breast cancer cells

The potential of TAL1 to alter ER α transcriptional activity in breast cancer cells is intriguing and therefore suggests that regulation of estrogenic genes targeted by ER α might be affected. We thus analyzed expression levels of a subset of ER α regulated genes in the context of TAL1 depletion using shTAL1 stably expressing MCF-7 cells. We found that the estrogenic upregulation of target genes, such as GREB1, TFF1(pS2), PGR and CXCL12, as determined in control shCtl MCF-7 cells, was further enhanced in treated shTAL1 MCF-7 cells (Fig. 6A). Interestingly, induction of MYC and CCND1 genes by estrogen was not significantly affected by TAL1 depletion, while their basal levels were enhanced compared to shCtl cells (Fig. 6A). As opposed to classic ERE-containing genes such as GREB1, TFF1, PGR and CXCL12, MYC and CCND1 genes are activated by estrogen through indirect binding of ER α to their respective promoter via AP-1 sites (36). To determine the prominent role of ERE on the repressive action

of TAL1 on ER α target genes, we performed luciferase assay using a reporter under the control of the pS2 proximal promoter which contains a functional ERE. As expected, both basal and E2-induced activities of the pS2-Luc reporter were further enhanced upon TAL1 depletion in MCF-7 cells compared to control (Fig. 6B). However, these effects of TAL1 depletion were abolished when the pS2 ERE site was mutated (Δ ERE-pS2-Luc). Consistent with this, the Δ ERE-pS2-Luc remained also unresponsive to ectopic expression of TAL1 in 293 cells compared to pS2-Luc (Fig. 6C). This suggests that the inhibitory effect of TAL1 on estrogen-responsive genes involves direct binding of ER α to ERE.

Since TAL1 also exerts a repressive effect on ER α activation by Ras^{V12}, we sought to determine whether this effect was ERE-dependent or not. Using the pS2-Luc reporter, which is highly responsive to Ras^{V12}, we found that TAL1 depletion further enhanced such activation in MCF-7 cells in absence or presence of estrogen (Fig. 6D), consistent with the inhibitory effect of TAL1 on ER α activity. However, while the response to estrogen was abolished, the effect of Ras^{V12} was maintained in the context of mutated ERE (Δ ERE-pS2-Luc) in shCtl and shTAL1 MCF-7 cells, indicating that the ERE was dispensable in the response to Ras.

TAL1 promotes repressive chromatin modifications at ER α targeted promoters

To better understand the impact of TAL1 on ERE-driven transcription of estrogenic genes, we performed ChIP experiments to determine ER α occupancy in the context of TAL1 knockdown. As expected, increases in ER α enrichment in response to estrogen were measured at EREs of the TFF1, PGR, and CXCL12 promoters in shCtl MCF-7 cells (Fig. 7A; *top panels*). However, no significant changes in ER α occupancy were observed when comparing shTAL1 with shCtl

cells, indicating that TAL1 does not affect ER α recruitment at EREs. These results preclude any ER α release from responsive promoters as a possible mechanism for TAL1 repression. We therefore considered whether histone modifications were involved to mediate TAL1 effect on ER α target promoters. We found that the H3K27me3 mark, known to be associated to transcriptionally inactive chromatin, was significantly reduced at the ERE of the TFF1, PGR, and CXCL12 promoters, when comparing estrogen-treated shTAL1 cells with shCtl cells (Fig. 7A; *middle panels*). In contrast, a significant enrichment in active H3K27ac histone mark was observed under the same conditions (Fig. 7A; *bottom panels*). These results suggest that in response to estrogen, TAL1 promotes an inactive chromatin landscape at ERE-driven promoters, resulting in transcriptional repression without altering ER α occupancy.

Transcriptional potential of coregulators on ER α is altered by TAL1

Given that ER α recruitment to target genes was not altered by TAL1 and that repressive histone marks were associated to TAL1 effects, we therefore sought to determine whether TAL1 could regulate the contribution of transcriptional coactivators to ERE-driven transcription. A number of coactivators of nuclear receptors are known to contain intrinsic or associated histone modifying activities, resulting in chromatin opening and transcription. Among which, CREB-binding protein CBP is considered a strong histone acetyl transferase, and the SRC/p160 family members were also reported to contribute to hormonal activation of a number of receptors, including ERs (15, 28). As expected, CBP and the three SRC members were all potent in promoting activation of ER α to estrogen and Ras in control MCF-7 cells (Fig. 7B). However, the coactivation potential of CBP and SRC-1, but not that of SRC-2 and SRC-3, was further

increased in the context of TAL1 depletion in response to E2. This suggests that TAL1 might regulate the transcriptional competence of ER α through specific cofactor usage at given target promoters.

TAL1 inhibits the growth and migration of breast cancer cells

The negative effect of TAL1 on ER α response to estrogen led us to ask whether TAL1 has a functional impact on breast cancer cell phenotype. We thus determined the effect of TAL1 on the growth potential of MCF-7 cells in the context of estrogen. We found that the estrogen-dependent growth stimulation rate of cells was significantly enhanced upon depleting TAL1 when compared to shCtl cells (Fig. 8A). The shTAL1 MCF-7 cells also showed a faster proliferation rate in absence of estrogen compared to control cells, consistent with a hormonal-independent effect of TAL1 in regulating the growth of MCF-7 cells. We next addressed the role of TAL1 on cell invasion phenotype and observed a significant increase in the estrogenic potential of TAL1-depleted cells to migrate after 72h of treatment compared to shCtl cells (Fig. 8B and C). To support these findings, we analyzed the expression of genes related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT), which includes the mesenchymal markers vimentin (VIM) and N-cadherin (CDH2). We found that estrogen markedly increased VIM and CDH2 expression in control MCF-7 cells (Fig. 8D), supporting a transition toward a metastatic phenotype over time. However, TAL1 knockdown contributed to further enhance the expression levels of VIM and CDH1 in response to estrogen. These results indicate that TAL1 can reduce the migration transition phenotype to MCF-7 cells when exposed to estrogen, and support a negative regulation of TAL1 of the EMT pathway in breast cancer cells.

Discussion

The transcriptional competence of nuclear hormone receptors to hormones is largely regulated by a number of coactivators, forming an intricate interaction complex to promote target gene transcription. Transcriptional corepressors are also recruited to maintain receptors in a basal state or to prevent or inhibit gene activation. Such recruitment of coregulators is therefore a crucial regulatory step in nuclear receptor signal transduction and proper complex assembly is essential to achieve normal physiological response but may also be altered in pathology, such as estrogen-dependent cancers. Here we identify a new corepressor for ERs, the hematopoietic transcription factor TAL1. This finding was very intriguing since most studies have examined the role of TAL1 in normal hematopoiesis and in leukemia, whereas little is known on its possible implication in other tissues.

TAL1 is a DNA-binding transcription factor and thus does not share any structural similarity with the recognized nuclear receptor corepressors, such as NCoR and SMRT. It does not contain an NR box, the signature motif consisting of a LXXLL motif known to directly interact with nuclear hormone receptors (42-44) , although the NR box is not always required, such as for REA (45). We also found that TAL1 binds to unliganded receptors and is released although partially upon E2 binding, which is similar to NCoR and SMRT but differs from corepressors REA, RIP140 and LCoR which are recruited to ER α in a ligand-dependent manner (44-47) .

Such partial decrease in TAL1 interaction in response to estrogen suggests that TAL1 may be released from ER α complex to allow it to function and activate its E2-dependent target genes by recruiting co-activators. However, remaining associated TAL1 appears to still repress ER α activity, as it is only upon TAL1 knockdown that a maximal ER α activity and target gene expression is achieved. Therefore, TAL1 repression for the E2-dependent activation of ER α is

likely to involve competition with coactivators for interaction with ER α , such as in the case of REA which decreases ER activity by interfering with SRC-1 access to the receptor (45). Consistent with this, we show that the coactivation potential of SRC-1 and of CBP to estrogen is increased with TAL1 knockdown, suggesting that TAL1 might interfere with SRC-1 and CBP mediated activation of ERs (34). Furthermore, an increase in the active mark H3K27ac and a decrease in the repressive mark H3K27me3 on the promoter of the target genes pS2, PgR and SDF-1 are observed in response to E2 without any changes in ER α recruitment to promoters following TAL1 knock-down. Our findings identify TAL1 as a novel repressor of estrogen receptors, underlying a distinct mechanism of impaired estrogen signaling in breast cancer cells. As opposed to estrogen, activation of the MAPK pathway by oncogenic Ras led to an enhanced recruitment of TAL1 to ER α , while still resulting in impaired receptor activation. This suggests a different mechanism of interaction of TAL1 with ER α in conditions of enhanced kinase signaling, which might depend on specific ER phosphorylation and /or various states of activation of TAL1. ER phosphorylation has been shown to promote cofactor recruitment and transcriptional regulation (31, 48) and phosphorylation is also reported to regulate TAL1 activity. In particular, the phosphorylation of Thr-90 by Akt kinase and Ser-122 by Erk1 kinase ERK results in transcriptional activation of TAL1 through modulation of the putative proline-rich transactivation domain in erythropoietic cells (49, 50). In addition, TAL1 can also be phosphorylated on residue Ser-172 by PKA, a modification that has been proposed to affect the binding of TAL1 to particular E-box motifs in a target-dependent manner (51) . Here, we observed that Ser-172 mutation severely impaired the interaction of TAL1 with ER α in response to Ras and to cAMP-mediated activation pathways, resulting in significant loss of the repressive effect of TAL1, this provides a critical role for Ser-172 phosphorylation as a recruiting signal

to interact with ER α and mediate receptor inhibition. Interestingly, Ser-172 phosphorylation was reported to destabilize TAL1 ability to associate with lysine specific demethylase LSD1, leading to enhanced TAL1 transcription and activation of target genes normally suppressed by TAL1-LSD1 complex in leukemic cells (27). However, LSD1 is rather associated to active promoters in breast cancer cells, where it is required for activation of ER α target genes in response to estrogen (52). Whether TAL1 phosphorylation at Ser-172 by which ER α is recruited and inhibited might infer with LSD1 interaction in the ER α complex assembly in breast cancer cells is not known and will require further investigation.

Phosphorylation of estrogen receptors is thought to be an essential mechanism for ligand-independent transcriptional activation of estrogen-responsive genes in breast cancer (53). Indeed, the ERs can be stimulated by a variety of growth factors and other kinase-induced signals, mimicking the effects of estrogen on expression of genes involved in cell growth and breast cancer proliferation independently of a hormonal signal. As such, up-regulated signaling by growth factor receptors, including members of the EGFR/ErbB family, is associated with failure of endocrine therapy (53-55). Consequently, enhanced activation of MAPK/Erk kinase pathway is recurrent in ER-positive cancer cells and in tumors of patients maintained on tamoxifen (56-59). Since our results indicate that TAL1 downregulates ER α basal transcription as well as the response to activation by MAPKs, it is expected that altered TAL1 expression and/or impaired repressive activity might promote tumor development and hormone-therapy resistance. Clearly, further studies will be needed to investigate if any molecular alterations of TAL1 correlate with breast tumor development.

Our results that TAL1 knockdown significantly increased the proliferation and migration of MCF-7 cells provide a functional role to TAL1 in the regulation of breast cancer cell behaviour.

Interestingly, ectopic expression of TAL1 has been shown to induce proliferation of human T-ALL cells by apoptosis inhibition (60), while TAL1 knockdown resulted in decreased growth and partial blockade of G2/M to G1 transition. Further gene expression profiling analysis after TAL1 knockdown also revealed downregulation changes in many genes among which NKX3.1 is required for the proliferation of TAL1-expressing T cell lines (61). Moreover, TAL1 knockdown inhibited cell proliferation and decreased entry into and traversal of the G1 and S phases, resulting in a delay in cell cycle progression of differentiating murine bone marrow monocyte precursors (62). As part of the mechanism, cell-cycle regulatory proteins CDKN1A (p21^{Cip1}) and CDKN2A (p16^{Ink4a}) normally known to be suppressed by TAL1 (63), were upregulated upon TAL1 knockdown in bone marrow monocyte precursors (62). Not much is known on the phenotypic role of TAL1 in breast cancer cells, but our results identify TAL1 as a negative regulator of cell growth, acting through inhibition of ERα activity and consequent decrease in estrogen-responsive proliferative genes.

Studies mostly done in endothelial cells have reported inhibitory effects of TAL1 on cell motility, since TAL1 overexpression inhibits migration (64). A more recent study has shown that TAL1 can up-regulate CDH5/VE-Cadherin expression, known to promote adhesion between endothelial cells (65). Our results suggest a similar role of TAL1 in breast cancer cells where TAL1 decreases cell migration potential, correlating with downregulation of mesenchymal markers Vimentin and CDH2/N-Cadherin in response to estrogen. These findings indicate that TAL1 expression results in impaired migration transition phenotype to MCF-7 cells when exposed to estrogen, supporting a role of TAL1 as a negative effector of the EMT pathway in breast cancer cells.

In conclusion, whereas the role of TAL1 during hematopoiesis and leukemia have been extensively investigated, its potential implication in other tissues remains unknown. We identify here TAL1 as new corepressor for ER α in MCF-7 breast cancer cell lines, it represents an important factor for regulation of ERs activity since it plays a dual role by repressing either the E2-dependent and independent activation of ER α , which may be a key in breast cancer treatment with anti-estrogens. Continued investigation on TAL1 repression of ER α response to MAPKs pathway and epigenetics changes upon TAL1 phosphorylation by PKA will certainly help in elucidating further aspects of the detailed mechanism of this ER α repressed transcription.

Reference

1. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(3):270-82.
2. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87(3):905-31.
3. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835-9.
4. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1535-65.
5. Lonard DM, O'Malley B W. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell.* 2007;27(5):691-700.
6. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol.* 2008;41(5):263-75.
7. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv.* 2005;5(6):343-57.
8. Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):335-44.
9. Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):610-7.
10. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncogene SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* 1996;86(1):47-57.
11. Robb L, Elwood NJ, Elefanti AG, Kontgen F, Li R, Barnett LD, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 1996;15(16):4123-9.
12. Hoang T, Lambert JA, Martin R. SCL/TAL1 in Hematopoiesis and Cellular Reprogramming. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:163-204.
13. Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, et al. The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. *EMBO J.* 1990;9(2):415-24.
14. Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(24):10128-32.
15. Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, et al. Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(13):5039-43.
16. Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, et al. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.* 1994;14(2):1256-65.
17. Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncogene in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.* 1991;11(6):3037-42.
18. Hsu HL, Wadman I, Baer R. Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(8):3181-5.

19. Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P, et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* 2006;25(2):357-66.
20. Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, Hamlett I, Guyot B, Iborra FJ, et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol.* 2005;25(23):10235-50.
21. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 1997;16(11):3145-57.
22. Lecuyer E, Hoang T. SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Exp Hematol.* 2004;32(1):11-24.
23. Huang S, Qiu Y, Stein RW, Brandt SJ. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene.* 1999;18(35):4958-67.
24. Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z, Brandt SJ. P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J.* 2000;19(24):6792-803.
25. Huang S, Brandt SJ. mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2000;20(6):2248-59.
26. Hu X, Li X, Valverde K, Fu X, Noguchi C, Qiu Y, et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(25):10141-6.
27. Li Y, Deng C, Hu X, Patel B, Fu X, Qiu Y, et al. Dynamic interaction between TAL1 oncoprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene.* 2012;31(48):5007-18.
28. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(6):2031-5.
29. Xia Y, Brown L, Tsan JT, Yang CY, Siciliano MJ, Crist WM, et al. The translocation (1;14)(p34;q11) in human T-cell leukemia: chromosome breakage 25 kilobase pairs downstream of the TAL1 protooncogene. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992;4(3):211-6.
30. Patel B, Kang Y, Cui K, Litt M, Riberio MS, Deng C, et al. Aberrant TAL1 activation is mediated by an interchromosomal interaction in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2014;28(2):349-61.
31. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell.* 1999;3(4):513-9.
32. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 1997;11(3):353-65.
33. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005;94(1-3):23-37.

34. Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001;77(1):19-27.
35. Rodrigue-Way A, Demers A, Ong H, Tremblay A. A growth hormone-releasing peptide promotes mitochondrial biogenesis and a fat burning-like phenotype through scavenger receptor CD36 in white adipocytes. *Endocrinology.* 2007;148(3):1009-18.
36. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res.* 2009;69(14):5793-800.
37. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res.* 1998;58(5):877-81.
38. Anantharaman A, Lin IJ, Barrow J, Liang SY, Masannat J, Strouboulis J, et al. Role of helix-loop-helix proteins during differentiation of erythroid cells. *Mol Cell Biol.* 2011;31(7):1332-43.
39. Xu Z, Huang S, Chang LS, Agulnick AD, Brandt SJ. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7585-99.
40. Draheim KM, Hermance N, Yang Y, Arous E, Calvo J, Kelliher MA. A DNA-binding mutant of TAL1 cooperates with LMO2 to cause T cell leukemia in mice. *Oncogene.* 2011;30(10):1252-60.
41. Cheng JT, Cobb MH, Baer R. Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):801-8.
42. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 1995;377(6548):454-7.
43. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 1995;377(6548):397-404.
44. Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, et al. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell.* 2003;11(1):139-50.
45. Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35848-56.
46. Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6947-52.
47. Treuter E, Albrechtsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol.* 1998;12(6):864-81.
48. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2010;21(2):104-10.
49. Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, Baer R. The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. *Oncogene.* 1994;9(12):3713-6.
50. Tang T, Prasad KS, Koury MJ, Brandt SJ. Mitogen-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced phosphorylation of the TAL1/SCL transcription factor in murine proerythroblasts. *Biochem J.* 1999;343 Pt 3:615-20.

51. Prasad KS, Brandt SJ. Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem.* 1997;272(17):11457-62.
52. Garcia-Bassets I, Kwon YS, Telese F, Prefontaine GG, Hutt KR, Cheng CS, et al. Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell.* 2007;128(3):505-18.
53. Sanchez M TA. Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. *Molecular Genetics of Cancer* 2005;5:149-85.
54. Britton DJ, Hutchesson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96(2):131-46.
55. Yue W, Fan P, Wang J, Li Y, Santen RJ. Mechanisms of acquired resistance to endocrine therapy in hormone-dependent breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;106(1-5):102-10.
56. Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58(18):4071-4.
57. McClelland RA, Barrow D, Madden TA, Dutkowski CM, Pamment J, Knowlden JM, et al. Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology.* 2001;142(7):2776-88.
58. Knowlden JM, Hutcheson IR, Barrow D, Gee JM, Nicholson RI. Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology.* 2005;146(11):4609-18.
59. Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI. Phosphorylation of ERK1/2 mitogen-activated protein kinase is associated with poor response to anti-hormonal therapy and decreased patient survival in clinical breast cancer. *Int J Cancer.* 2001;95(4):247-54.
60. Condorelli GL, Tocci A, Botta R, Facchiano F, Testa U, Vitelli L, et al. Ectopic TAL1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2954-69.
61. Kusy S, Gerby B, Goardon N, Gault N, Ferri F, Gerard D, et al. NKX3.1 is a direct TAL1 target gene that mediates proliferation of TAL1-expressing human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2010;207(10):2141-56.
62. Dey S, Curtis DJ, Jane SM, Brandt SJ. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol Cell Biol.* 2010;30(9):2181-92.
63. Hansson A, Manetopoulos C, Jonsson JI, Axelson H. The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(4):1073-81.
64. Lazrak M, Deleuze V, Noel D, Haouzi D, Chalhoub E, Dohet C, et al. The bHLH TAL1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 7):1161-71.
65. Deleuze V, Chalhoub E, El-Hajj R, Dohet C, Le Clech M, Couraud PO, et al. TAL1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27(7):2687-97.

Figures Legends

Fig. 1. TAL1 is expressed in reproductive cancer cells

(A) Schematic representation of the SCL/TAL1 protein with functional domains and phosphorylation sites, the truncated form is also represented. **(B)** qPCR analysis of TAL1 mRNA levels in breast, endometrial and ovarian cancer cell lines. **(C)** Western analysis of TAL1 and ER α protein levels in breast, endometrial and ovarian cancer cell lines.

Fig. 2. TAL1 is a novel cofactor of ER α and ER β in breast cancer cells

(A, B) TAL1 interaction with ERs is enhanced by phosphorylation. HEK-293 cells were cotransfected with ER α **(A)** or ER β **(B)** and HA-TAL1 plasmid in the presence or absence of RasV12 to activate the MAPK pathway. Cells were then treated or not with 10nM E2 for 16h. Immunoprecipitation was carried out with an antibody specific to ER α or ER β . Co-immunoprecipitated HA-tagged TAL1 was detected with an anti-HA antibody. **(C)** Estrogen decreases the interaction between Tal-1 and ER α . HEK-293 cells were transfected with ER α and HA-Tal-1 wt plasmid, before E2 treatment for the indicated times (30', 3h or 6), cells were also transfected with RasV12 with or without E2 for 6h. **(D)** Endogenous interaction between ER α and Tal-1. MCF7 cell lysates were prepared and immunoprecipitated with pre-immune serum (IgG) or an antibody anti-ER α in the presence of 10 nM E2 or RasV12. Precipitated proteins were revealed by WB using anti-TAL1 and anti-ER α antibodies. **(E)** 293T cells were transfected with an ERE-tk-luc reporter and expression plasmid for ER α in the presence or absence of TAL1 (100 ng). Cells were also transfected with RasV12 plasmid and then treated or not with 10 nM E2 for 16h and lysed for measurement of luciferase activity. Luciferase values

were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold activation compared with untreated cells set at 1.0. (n=4-8, *P<0.01, **P<0.05 and ***P<0.005). **(F)** MCF-7 cells were transduced with an shRNA against TAL1 (shTAL1) or a scramble ShRNA (ShCtl). Luciferase assays using the ERE-tk-luc reporter were performed in the presence or absence of RasV12 plasmid. Cells were treated or not with 10 nM E2 for 16h and luciferase values are expressed as in E. (n=3, *P<0.01, **P<0.05 and ***P<0.005). **(G)** MCF-7 cells were transduced with an shRNA against TAL1 (shTAL1) or a scramble ShRNA (shCtl) and knockdown efficiency evaluated by quantitative real-time PCR. Error bars represent the SEM from at least three experiences. **, P < 0.005.

Fig. 3. TAL1 regulation of ER α is not DNA-dependent

(A) 293T were transfected with ER α and HA-TAL1 full length or truncated constructs (Δ basic or Δ 1-176) with or without RasV12 and immunoprecipitation was carried out with an antibody specific to ER α , samples were then immunoblotted for the presence of HA-TAL1 full length or truncated using an HA antibody. **(B)** 293T cells were transfected with an ERE-tk-luc reporter and expression plasmid for ER α in the presence or absence of TAL1 full length or truncated forms corresponding to the N-terminal or the C-terminal region. Cells were also transfected with RasV12 plasmid. Luciferases values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared with control cells set at 1.0. (n=4, **P<0.05 and ***P<0.005).

Fig. 4. TAL1 regulation of ER α to Ras activation requires Serine 172

(A) 293T were transfected with ER α and HA-TAL1 wt or mutants constructs (S122A, S172A) with or without RasV12 and immunoprecipitation was carried out with an antibody specific to ER α . Samples were then immunoblotted for the presence of HA-TAL1 wt or mutants using an HA antibody. **(B)** 293T cells were transfected with EREtkLuc reporter, ER α plasmid and expression vector encoding TAL1 wt or mutants (S122A, S172A) in the presence or absence of RasV12 plasmid. Luciferases Values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared with control cells set at 1.0. (n=4, **P<0.05 and ***P<0.005).

Fig.5. Serine 172 phosphorylation of TAL1 by PKA modulates TAL1 interaction with ER α

(A) 293T cells were cotransfected with ER α and HA-TAL1 plasmids, pre-treated or not with 20 μ M of the PKA inhibitor H89 for 1h before treatment with vehicle or 40 μ M of the PKA activator, forskolin for 2, 4 or 6h. Immunoprecipitation assay were carried out with an anti-ER α antibody, Coimmunoprecipitated HA-tagged TAL1 was detected with an anti-HA antibody. **(B)** 293T cells were cotransfected with ER α and HA-TAL1 plasmids in presence or absence of RasV12 and treated or not with 20 μ M of the PKA inhibitor H89 for 3h. **(C)** 293T cells were cotransfected with ER α and HA-TAL1 wt or mutants constructs in presence or absence of 40 μ M of the PKA activator, forskolin for 6h. Co-immunoprecipitation assay was carried as in (A).

Fig.6. Direct effect of TAL1 on ER α target genes through EREs in response to E2

(A) q-RT-PCR analysis of TAL1 knock down effect on a sub-set of ER α target gene after E2 treatment in MCF-7 shCtl or shTAL1 stable cell lines. Cells were treated with 10nM E2 for 16h, and results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to ShCtl vehicle-treated cells set at 1.0. Error bars represent the SEM from at least three

experiences. *, P < 0.05; **, P < 0.005. **(B; C)** Effect of TAL1 on the transcriptional activity of ER α . **(B)** Luciferase assays using the pS2-Luc reporter were performed in MCF7 shCtl and shTAL1 stables cell lines treated with 10nM E2 for 16 h. Luciferases values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared with control cells set at 1.0. **(C)** Luciferases assay same as in **(B)** except the use of the Δ ERE-pS2-Luc reporter. **(D)** TAL1 repressive effect on ER α response to MAPKs is ERE-independent. Luciferase assays using the pS2-Luc or Δ ERE-pS2-Luc reporter were performed in MCF7 ShCtl and shTAL1 stables cell lines in the presence or absence of RasV12 plasmid. Cells were treated or not with 10nM E2 for 16h. Luciferases Values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared with control cells set at 1.0.

Fig.7. TAL1 promotes repressive chromatin modifications at ER α target promoters.

(A) ChIP assays were performed using MCF-7 ShCtl and ShTAL1 stable cell lines. Cells were treated with E2 for 45min, immune complexes were precipitated with an anti-ER α , anti H3K27 Ac or H3K27me3 antibodies and ChIP data were shown by quantitative PCR using a primer set covering EREs of pS2/TFF1, PR and SDF-1 genes. **(B)** MCF7 ShCtl and shTAL1 stables cell lines were transfected with an ERE-tk-luc reporter, expression vectors for SRC-1, CBP, GRIP-1 and PCIP, in presence or absence of RasV12 plasmid. Cells were treated or not with 10nM E2 for 16h and luciferases Values were normalized to β -galactosidase activity and expressed as fold response compared with control cells set at 1.0. (n=4, *P<0.05, ***P<0.005).

Figure 8: Effect of TAL1 depletion on cell growth and migration in response to E2.

(A) shCtl and shTAL1 MCF-7 stable cells (10^5 per well) were treated or not with 10 nM E2 over a period of 72h with freshly added medium change every 24h. Cell growth was monitored by impedance using the xCELLigence system (ACEA Bioscience, Inc.) and expressed as relative cell proliferation according to the CI (cell index) value provided by the RTCA software. Each analysis was carried out in duplicate and results are derived from at least three independent experiments. **(B)** MCF7 ShCtl and ShTAL1 stable cell lines were plated in 6 well plates until they reached 80% confluency, cells were scratched using 10 μ l pipette tip and then treated or not with 10nM E2. Captured images at different time points (0, 24, 48 and 72 h) were analyzed by ImageJ. Error bars represent the mean \pm s.d. ($n = 3$, * $p < 0.05$ compared to mock). **(C)** The healing of the scratch wound was monitored at different time points (0, 24, 48 and 72 h) by taking bright field images (Zeiss Axio Imager, ZEISS, CA) and the average extent of wound closure was determined by measuring the width of the migratory distance of cells using the NIH Image J software. Results are derived from three independent experiments. **(D)** q-RT-PCR analysis of TAL1 knock down effect on epithelial-mesenchymal transition (EMT), markers upon E2 treatment in MCF-7 ShCtl or Sh-TAL1 stable cell lines. Cells were treated or not with 10nM E2 for 16h, 24h, 48h and 72h and results were normalized to RPLP0 expression and expressed as fold response compared to ShCtl vehicle-treated cells set at 1.0. Error bars represent the SEM from at least three experiences.

Fig.1

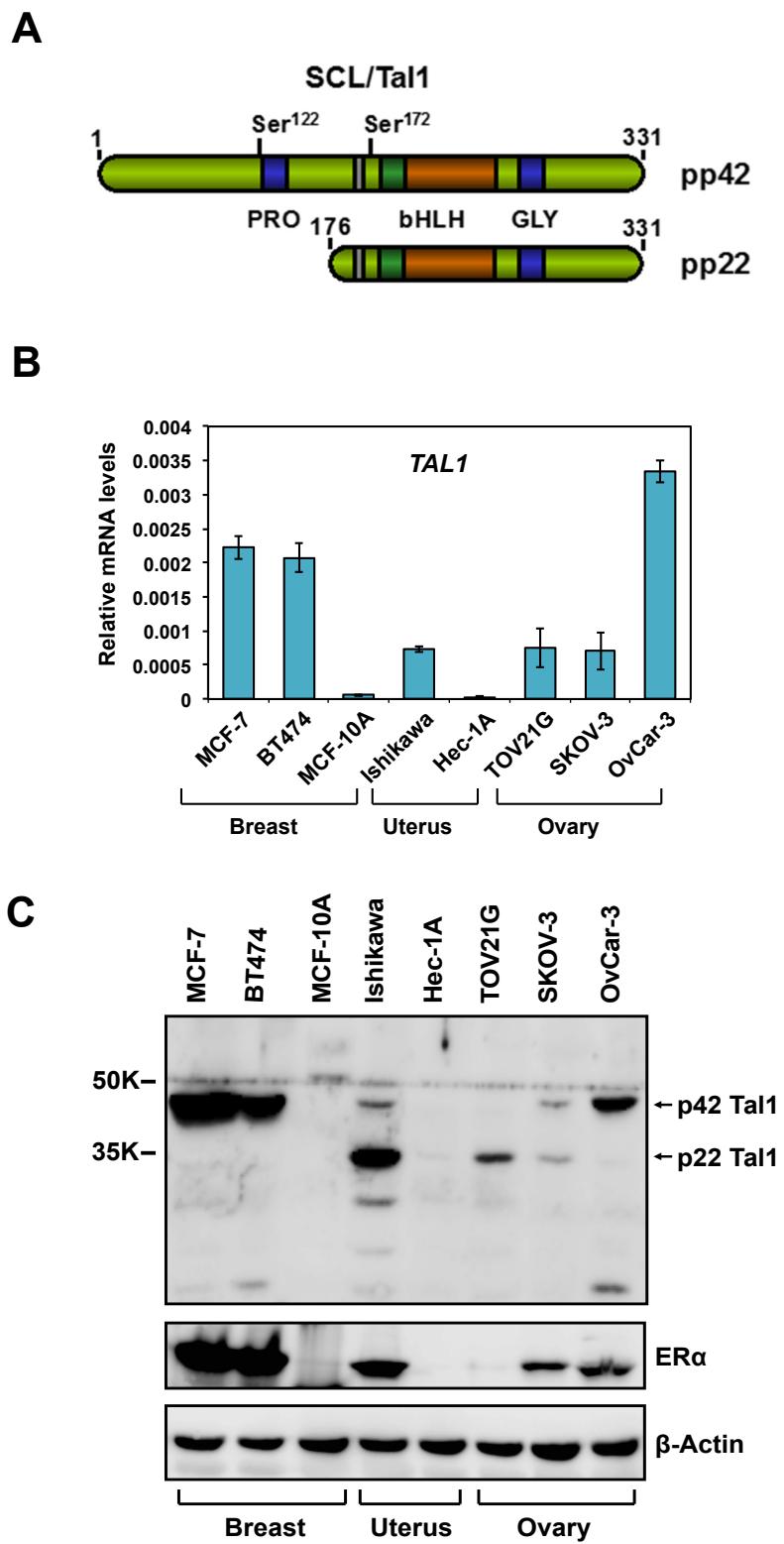


Fig.2

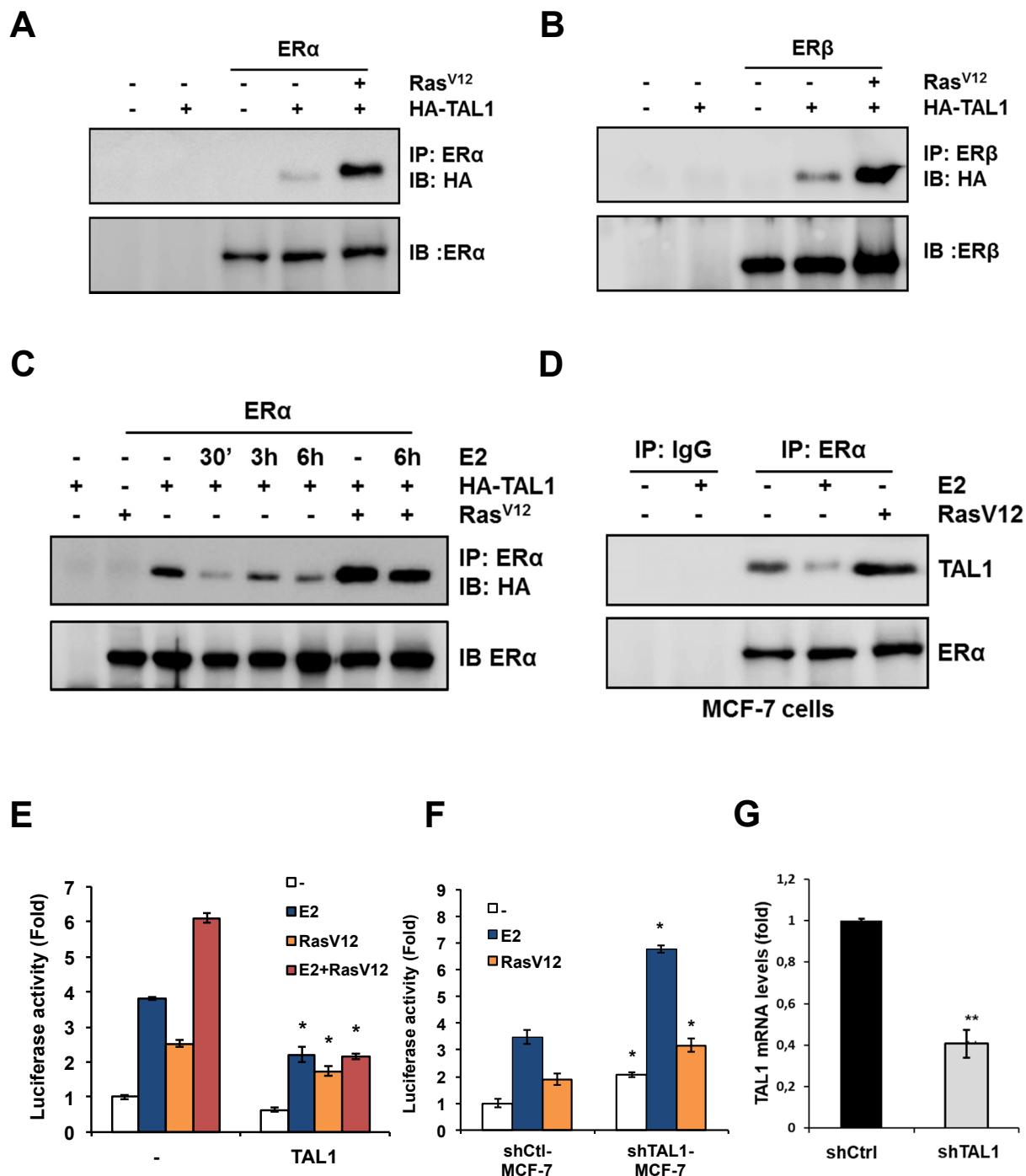


Fig.3

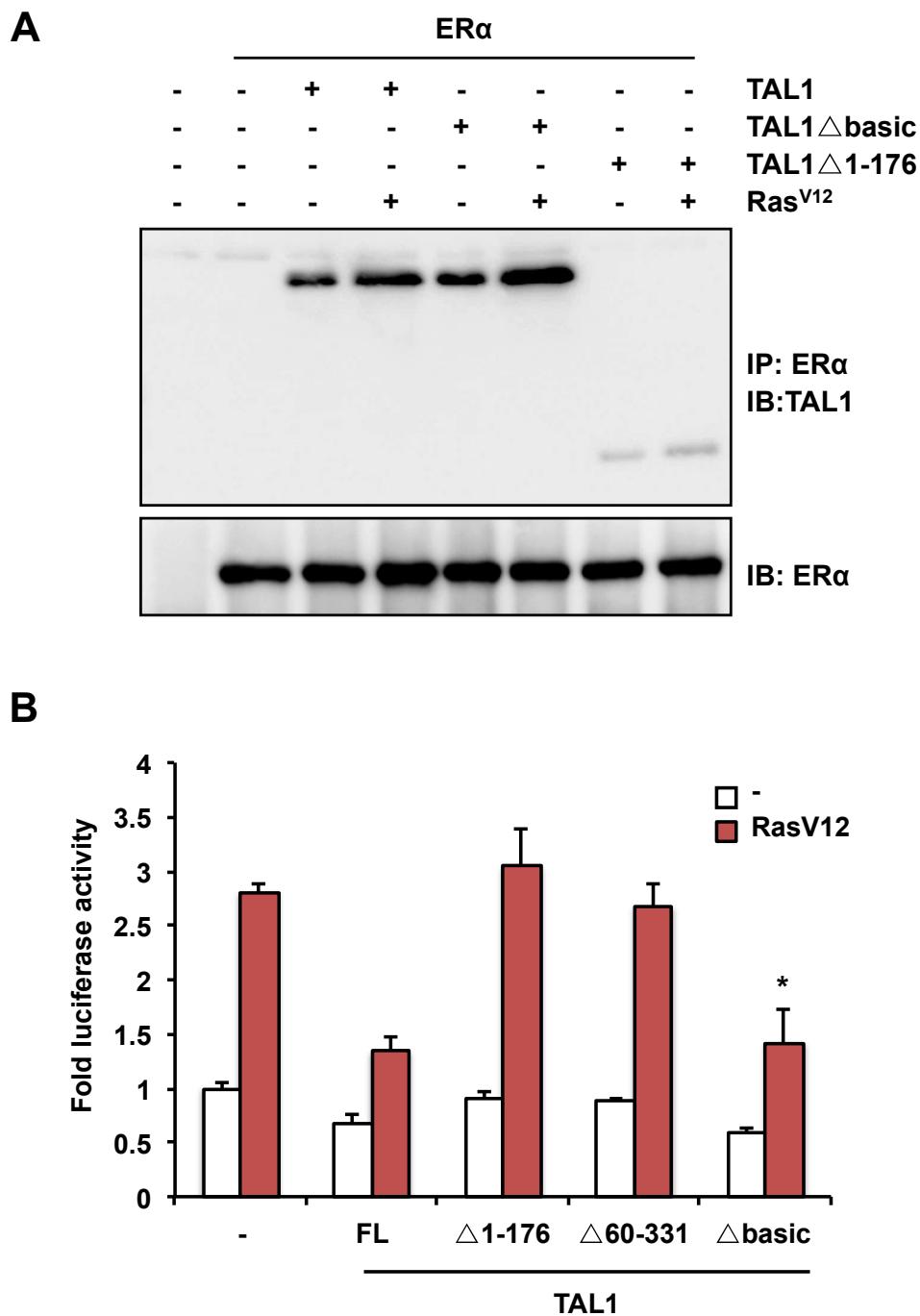
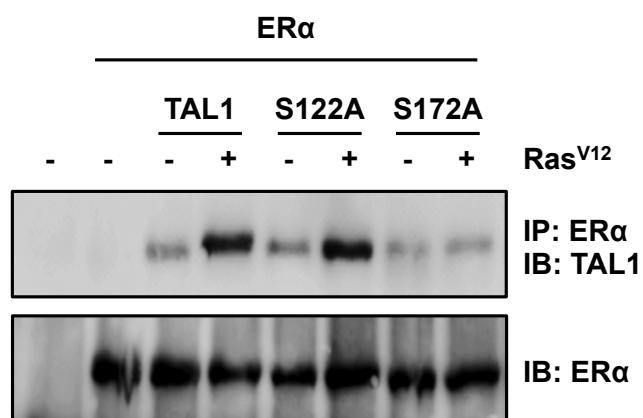


Fig.4

A



B

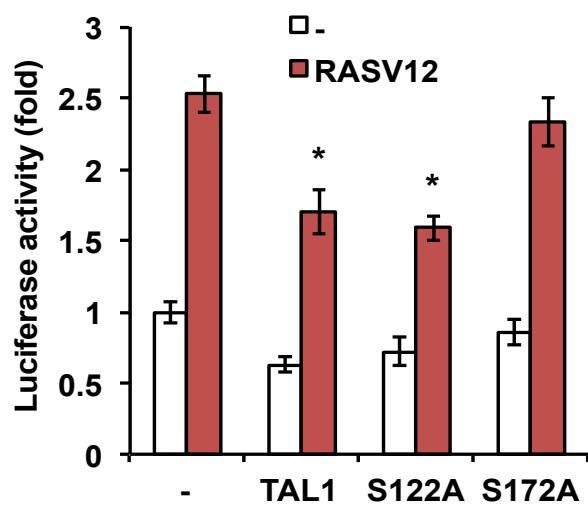


Fig.5

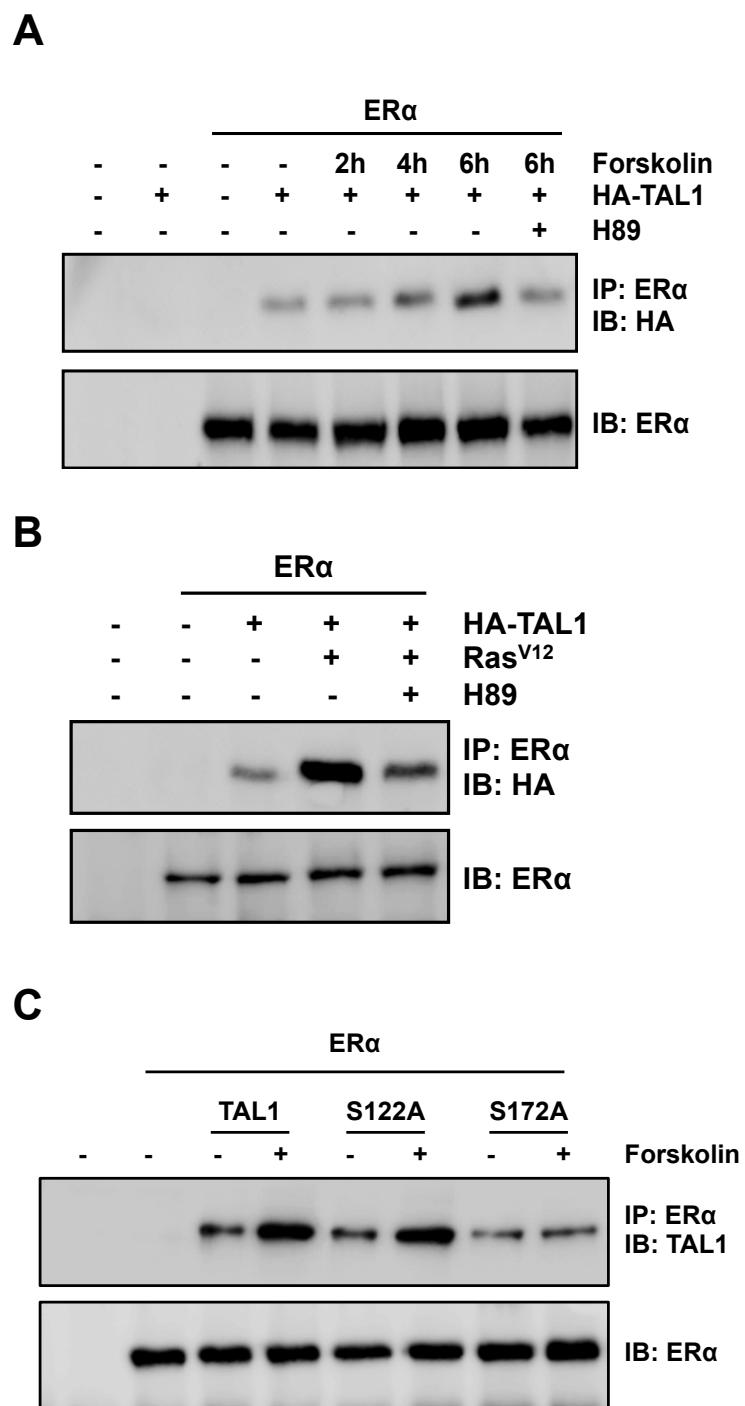
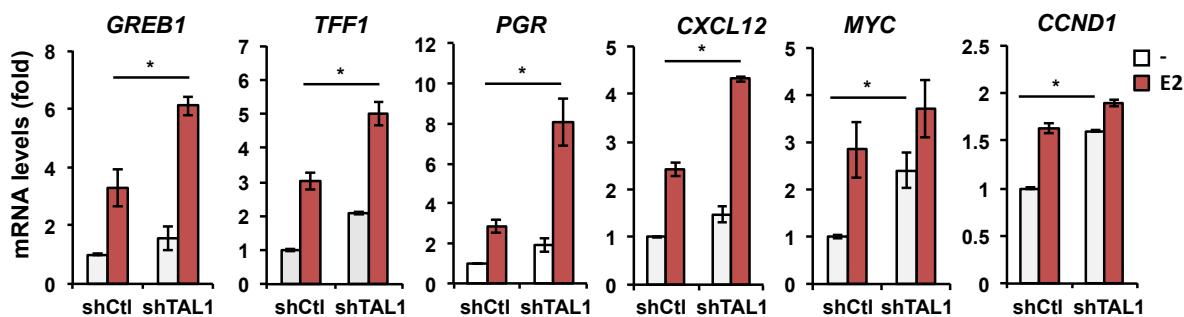
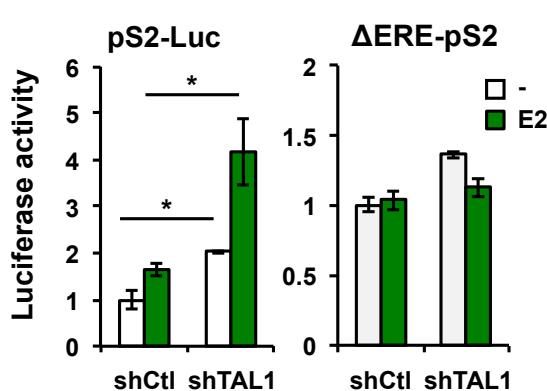


Fig.6

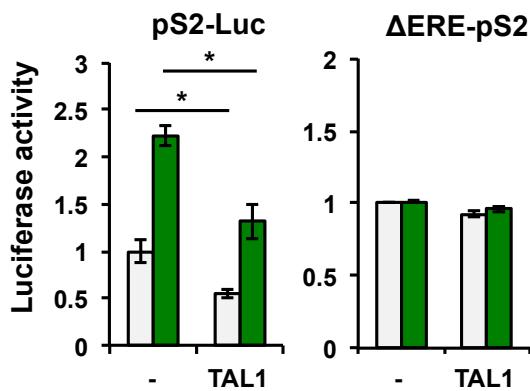
A



B



C



D

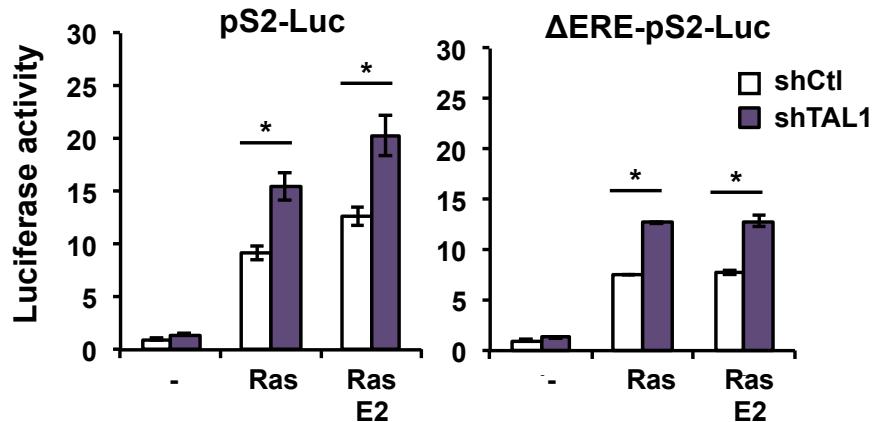
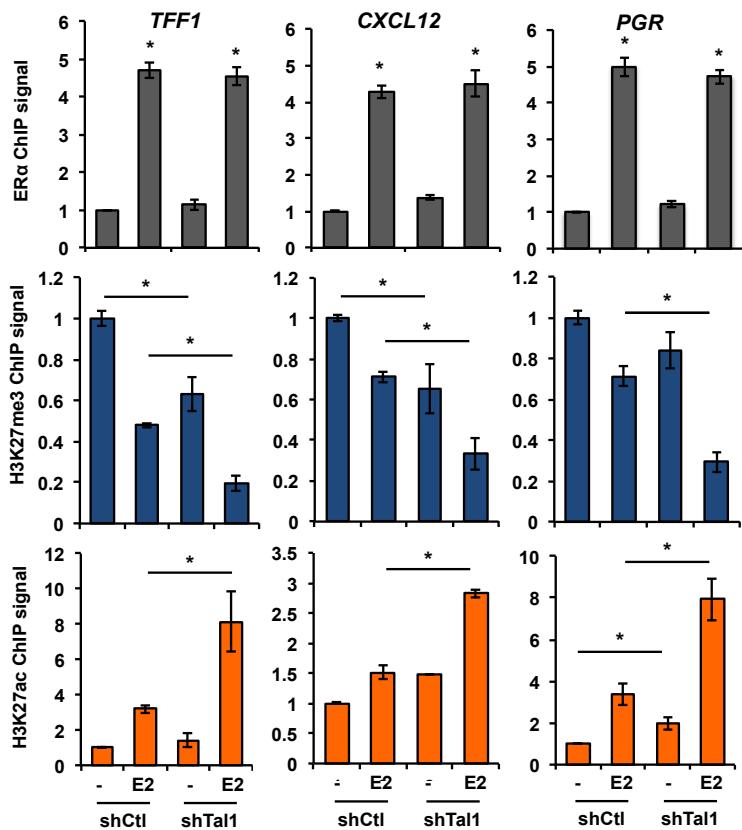


Fig.7

A



B

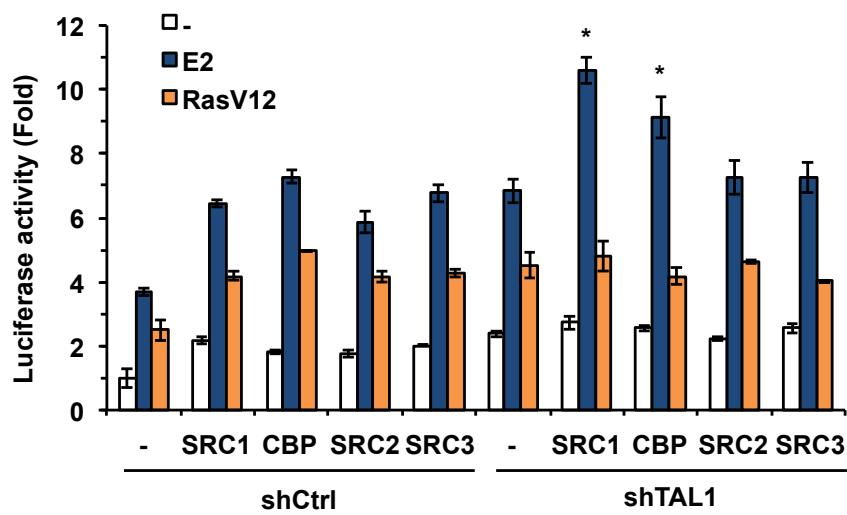
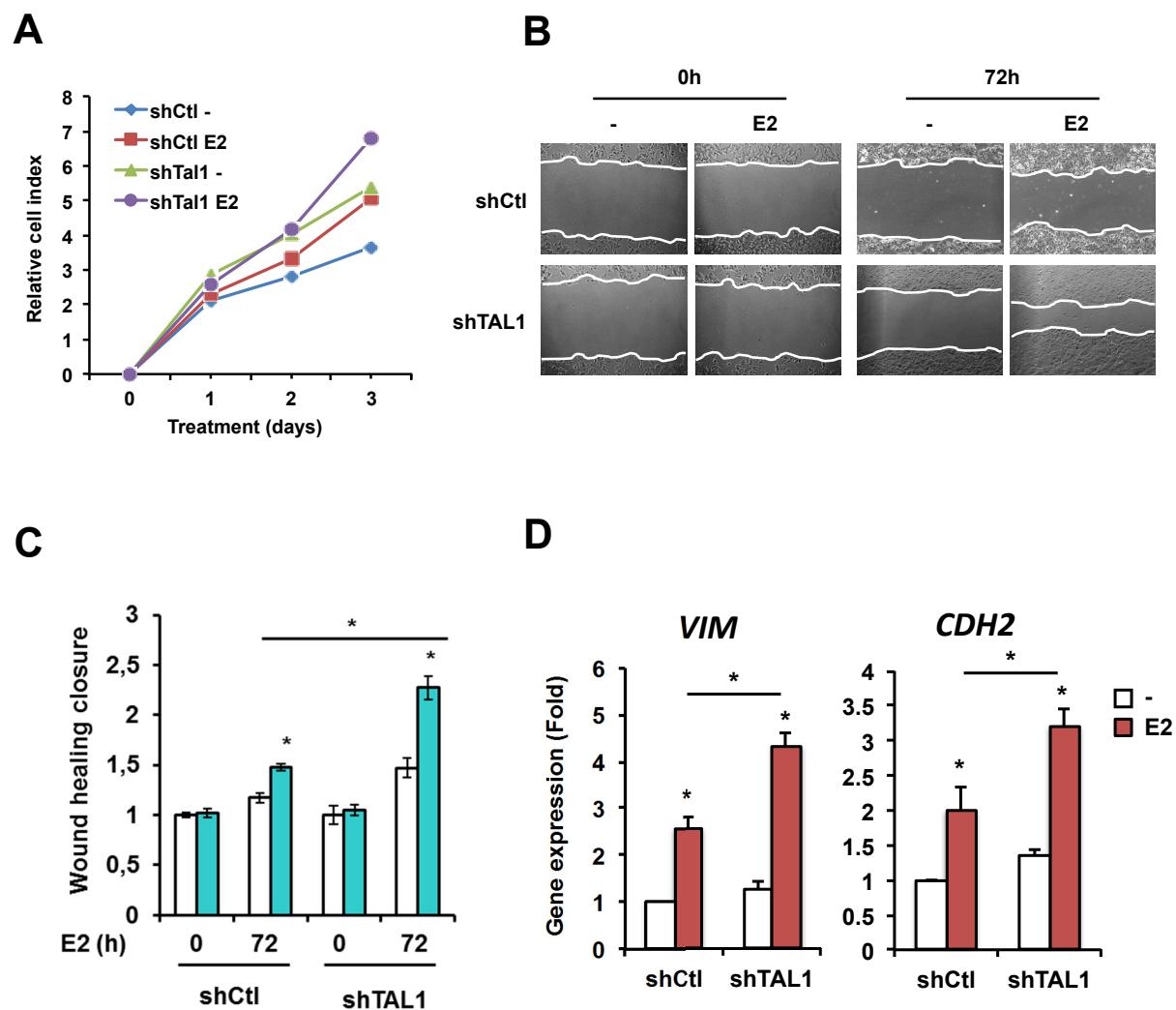


Fig.8



Chapitre 3 Discussion générale, perspective et conclusion

Discussion

6.1 Identification d'un gène cible du récepteur de l'estrogène ER α

6.1.1 Régulation de l'expression du gène de la hyaluronidase HYAL-1 par ER α et les estrogènes

Les anomalies chromosomiques et génomiques au niveau du locus 3p21.3 sont des événements fréquents liés à des cancers épithéliaux, notamment les cancers de l'ovaire et du sein. C'est dans cette région que se retrouvent les gènes hyaluronidases HYAL-1, HYAL-2 et HYAL-3. HYAL-1 est particulièrement surexprimé dans plusieurs cancers, tels que la prostate, la vessie, le cou, la tête et le sein (331-334, 338, 342). Toutefois, en dépit de tout ce qui est connu maintenant sur HYAL-1 et son implication dans la tumorigenèse, peu d'informations existent sur la régulation de l'expression de ce gène. En effet, seules quelques études ont examiné la régulation des hyaluronidases. L'un des mécanismes de cette régulation est l'épissage alternatif de l'ARNm qui se traduit par plusieurs variants qui codent pour des protéines enzymatiquement inactives (448). Il a été démontré que l'un des variants d'épissage appelé HYAL1-v1, agit comme un régulateur négatif de la croissance tumorale, de l'invasion et l'angiogenèse (340). Une étude a montré que BMP-7 (Bone morphogenetic protein-7) diminue l'expression de l'ARNm de HYAL-1 et HYAL-2 dans les cellules tubulaires rénales (449). À l'inverse, l'Interleukine 1 β augmente l'expression de HYAL-1 dans les fibroblastes des ligaments parodontaux (450), tandis que TGF- β l'augmente dans les fibroblastes dermiques.

(451). Plus récemment, l'identification du promoteur proximal de HYAL-1 a révélé une régulation épigénétique par la liaison de différents facteurs de transcription : Sp-1, AP-1, Egr-1 et NFkB au promoteur de HYAL-1 méthylé ou non (446). À l'exception de ces études, on connaît très peu sur la régulation du gène HYAL-1 et les études pour la plupart se sont concentrées sur l'expression et le rôle de HYAL-1 dans le cancer de la prostate et de la vessie. Dans une publication antérieure, notre laboratoire a aussi démontré une expression élevée de HYAL-1 dans le cancer épithelial de l'ovaire de type mucineux et à cellules claires. Fait intéressant, cette expression élevée de HYAL-1 était inversement corrélée à celle du gène codant ER α soit ESR1 (444). Il a également été rapporté que les lignées du cancer du sein ER (-) ont aussi un niveau élevé de HYAL-1 par rapport aux lignées ER (+) (445), suggérant un rôle pour ER α dans la régulation de HYAL-1. En accord avec ces observations, notre analyse de l'expression de HYAL-1 dans la cohorte METABRIC constituée de 1980 cas de cancer du sein a révélé la même corrélation inverse entre ESR1 et HYAL-1, mais pas avec les autres hyaluronidases, HYAL-2 et HYAL-3. Par ailleurs, une étude a décrit une relation entre le substrat des hyaluronidases, le hyaluronan et ER α et a montré que l'interaction CD44-hyaluronan induit une cascade d'événements incluant l'activation de la kinase Erk2, aboutissant à la phosphorylation d'ER α dans le cancer ovarien de type séreux (452). De ce fait, même si un certain nombre de rapports ont adressé la régulation des hyaluronidases, notre étude est la première démonstration d'une relation directe entre la hyaluronidase HYAL1 et ER α .

6.1.2 HYAL-1, un gène cible réprimé de façon sélective par ER α et les estrogènes

Conformément à ces résultats, mes recherches ont par la suite confirmé la régulation de HYAL-1 par l'estrogène en identifiant HYAL-1 comme étant un gène cible réprimé par ER α . Le traitement des lignées cancéreuses mammaires ER (+), MCF-7 et BT-474 avec E2 a significativement diminué l'expression de l'ARNm et de la protéine HYAL-1 comparativement aux cellules non traitées. Ces résultats indiquent que HYAL-1 est négativement régulé par ER α en réponse à l'estrogène. Les études de microarray ont rapporté que dans les cellules MCF-7, pour 43 % des gènes réprimés par ER α , le tamoxifène a un effet partiel sur la répression alors que pour 26 %, le tamoxifène abolit complètement l'effet répressif de l'estrogène (453), les 31 % restants sont aussi inhibés en réponse au tamoxifène. De façon similaire à ce qui a été observé dans la littérature sur les gènes réprimés par ER α (454, 455), nous démontrons que l'anti-estrogène partiel, tamoxifène a eu un léger effet sur l'expression du gène HYAL-1 tant dis que l'ICI n'a eu aucun effet vu que c'est un anti-estrogène pur qui entraîne la dégradation d'ER α . De plus, les cellules MCF-7 et BT-474 présentent une diminution des niveaux protéiques basaux de HYAL-1 comparées aux lignées ER (-) : la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 et la lignée épithéliale du cancer de l'ovaire TOV21-G, ce qui est en accord avec la corrélation inverse entre ESR-1 et HYAL-1 observées chez les patientes ayant un cancer de l'ovaire (444) et dans la cohorte METABRIC de cancer du sein. Cette répression est sélective à HYAL-1 puisque les autres gènes situés sur le même chromosome 3p21.3 ne sont soit pas affectés par l'estrogène comme c'est le cas pour HYAL-2 et HYAL-3, NAT6 et TUSC2 ou bien sont augmentés comme c'est le cas pour SEMA-3F et SEMA-3B qui sont d'ailleurs connus pour être activés par l'estrogène (456, 457).

6.1.3 Recrutement d'ER α sur le promoteur de HYAL-1

La plupart des études ayant été faites dans le passé sur la régulation de l'expression de gènes par ER α portent sur des gènes activés. Aujourd'hui, les avancées technologiques récentes ont permis d'analyser le génome humain en entier et ont pu cartographier les sites de liaison d'ER α suite au traitement avec l'estrogène par immunoprecipitation de chromatine couplée à des microarray (ChIP on CHIP) ou couplée avec des séquençages à haut débit (ChIP-seq). Ces études ont révélé que dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7, sur plus de 400 gènes régulés par ER α , 70 % sont en fait réprimés (458-460). Des résultats précédent de ChIP-Seq à partir de cellules MCF-7 traitées avec l'estrogène a mis en évidence 69452 site de liaison de ER α sur tout le génome. L'analyse de ces résultats nous a permis d'identifier plusieurs de ces sites sur le chromosome 3p21.3 dans certains à proximité du gène HYAL1 mais aussi proche des gènes SEMA3B, SEMA3F et RASSF1 qu'on avait déjà montré comme étant augmenté par l'estrogène par q-PCR. Lors de cette analyse ChIP-Seq, nous avons aussi cartographié la H3K27Ac, qui est une marque d'histone associée à l'activation transcriptionnelle et comme attendue, nous avons retrouvé cette marque sur les gènes SEMA3B, SEMA3F et RASSF1. Par contre, nous n'avons observé aucun enrichissement de la marque positive H3K27Ac en présence d'estrogène dans la région génomique située dans la région 5' du gène HYAL1, ce qui suggère un état répressif de la chromatine proche de HYAL1.

Comme mentionné précédemment, ER α peut exercer son action sur ses gènes cibles de façon directe, en interagissant avec les EREs ou bien indirectement en se liant au promoteur via un autre facteur de transcription qui lie l'ADN tels que Sp-1 (461, 462), AP-1 (96, 255), NF κ B (463). L'identification du promoteur proximal de HYAL-1 (-93 +17) par Lokeshwar et son équipe a d'ailleurs révélé la présence de sites de liaison pour certains facteurs de transcription :

NFkB et egr-1, Sp-1 et AP-1 (446), mais jusqu'à présent aucune séquence ERE n'avait été retrouvée sur le promoteur de HYAL-1. Il a été observé dans les cellules cancéreuses mammaires, que les gènes sensibles à l'estrogène ont souvent un ERE ou un demi-ERE positionné à côté d'un site de liaison Sp1 (464). Notre analyse ChIP-Seq a révélé, en plus du site Sp-1 connu, situé à -60 pb du site d'initiation de la transcription (446), un autre Sp-1 à -1020 pb. Nous avons également identifié pour la première fois 5 EREs sur le promoteur de HYAL-1 à travers lesquels ER α peut potentiellement exercer son effet répresseur dont un ERE à -900 pb, donc très proche du Sp-1 -1020 pb et 4 autres distaux à environs -30-50 Kb. Les résultats de ChIP-qPCR nous ont permis de confirmer le recrutement significatif d'ER α en réponse à l'estrogène sur le Sp-1 -1020 comparativement au Sp-1 -60 et sur 3 des 5 EREs identifiés soit le ERE-900, ERE-13500, et un peu moins sur le ERE-32250 comparativement aux 2 autres EREs, les plus distaux : ERE-42430 et ERE-50130 qui présentent un faible recrutement d'ER α .

6.1.4 Mécanisme de la répression de HYAL-1 par ER α

Fait intéressant, le recrutement d'ER α sur les sites ERE -900 et le Sp-1 -1020 s'accompagne par un enrichissement de la méthylation de lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3) qui est une marque d'histone répressive, ce qui confirme les résultats du ChIP-Seq qui ont révélé l'absence de la marque active la H3K27Ac au niveau du promoteur de HYAL-1. Nos résultats démontrent ainsi, non seulement un enrichissement de la H3K27me3 sur le promoteur de HYAL-1 au niveau du ERE -900 et Sp-1 -1020, mais également un profil de la H3K27me3 associée au recrutement d'ER α variable au niveau du chromosome 3p21.3 qui permet d'activer ou de réprimer l'expression de gènes de façon sélective.

Étant donné que la plupart des études se sont concentrées sur l'activation de la transcription par les ERs, la liste des gènes réprimés pour lesquels les mécanismes de la régulation négative par ER α ont été déterminés est relativement faible. C'est pourquoi le mécanisme derrière la répression induite par E2 n'est pas clairement connu et il existe probablement plusieurs mécanismes responsables de la répression génique par ER α . De façon générale, la répression de la transcription génique par les récepteurs des estrogènes implique le recrutement de corépresseurs qui recrutent à leur tour les enzymes modifiant les histones, capables d'inhiber la transcription en induisant la condensation de la chromatine la rendant de ce fait inaccessible à la machinerie transcriptionnelle.

Parmi les quelques études ayant examiné le phénomène de répression de l'expression de gènes par ER α , certaines ont impliqué les corépresseurs NCoR et SMRT dans la répression transcriptionnelle (465, 466). NCoR et/ou SMRT sont notamment recrutés sur les promoteurs de plusieurs gènes négativement régulés par l'estrogène incluant : cyclin G2 (454), VEGFR2 (467), Slug (468), TAFII30 (469). De notre côté, nous n'avons pas observé le recrutement de NCoR ni SMRT sur le promoteur de HYAL-1 en réponse à l'estrogène (résultats non montrés), ce qui suggère l'existence de différents mécanismes menant à la répression transcriptionnelle par ER α . D'autres corépresseurs par exemple, le REA et RIP140 sont recrutés sur le promoteur de PROS-1 (470) et BTG2 (455) respectivement. La désacétylation des histones par les HDACs est aussi un événement fréquent qui accompagne la répression génique (471). Dans notre étude, nous n'avons pas détecté la désacétylation, mais plutôt la méthylation de la lysine 27 sur l'histone3 sur le promoteur de HYAL-1 en réponse à l'estrogène sur les sites ERE -900 et Sp-1 -1020.

La méthylation la lysine 27 sur l'histone3 est catalysée par EZH2 (Enhancer of Zeste homolog 2), une méthyltransférase spécifique de la H3K27 (472). La triméthylation de la H3K27 par EZH2 contribue au recrutement des complexes répressifs de Polycomb (PRC1 et PRC2) sur la chromatine, qui à leur tour vont induire la répression de l'expression des gènes associée à la condensation de la chromatine (473, 474). EZH2 est surexprimée dans plusieurs cancers, notamment le cancer du sein, et il a été démontré que son expression est induite par l'estrogène (475, 476). Fait intéressant, EZH2 interagit avec le corépresseur REA pour réprimer l'expression de gènes (477), est-ce que EZH2 est recruté sur le promoteur de HYAL-1 en réponse à l'estrogène reste à déterminer.

EZH2 est d'autant plus un bon candidat puisqu'elle n'interagit qu'avec ER α et pas avec ER β (478). Cette sélectivité concorde avec nos résultats où l'on démontre aussi que la répression de HYAL-1 est spécifique à ER α puisque HYAL-1 est sélectivement diminué par l'agoniste d'ER α , le PPT (propylpyrazoletriol) et pas par l'agoniste d'ER β , le DPN (diarylpropionitrile). De la même façon, dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231 qui exprime stablement ER β , l'expression de l'ARNm de HYAL-1 est la même que dans la lignée parentale MDA-MB-231 tant qu'à la lignée MDA-MB-231-ER α , l'expression de HYAL-1 est diminuée.

Par ailleurs, dans nos résultats de ChIP, nous démontrons une augmentation du recrutement d'ER α sur le promoteur de HYAL-1 en réponse à E2, comme ce qui a été observé sur le promoteur des gènes Cyclin G2 (454), Slug (468) et PROS-1 (470). Ceci n'est pas une caractéristique commune à tous les gènes réprimés par ER α puisque d'autres comme BTG2 (455), E-Cadhéline (479) ne présentent pas cette augmentation sur leurs promoteurs. Un tel recrutement favorisé d'ER α en réponse à l'estrogène peut à son tour favoriser le recrutement de corépresseurs.

6.1.5 Rôles respectifs des sites ERE -900 et Sp-1 -1020 dans la répression de HYAL-1 par ER α

Après avoir identifié les sites ERE-900 et Sp-1 -1020, impliqués dans le recrutement d'ER α et la répression de l'expression de HYAL-1, nous avons voulu déterminer l'importance et la contribution respective de chacun de ces deux sites dans cette répression. Pour ce faire, nous avons d'abord généré par PCR la région de 1,5 Kb flanquant l'exon 1 du promoteur HYAL-1 et contenant l'ERE à -900 ainsi que les deux sites Sp-1 (à -60 et -1020 pb), et l'avons cloné en amont du gène rapporteur luciférase, en plus de trois autres constructions tronquées ne contenant soit pas le Sp-1 -1020 ou les deux, le Sp-1 et le ERE-900 ou bien ayant le ERE-900 muté. Le site Sp-1 -60 identifié auparavant a été associé à une diminution de l'expression de HYAL-1 dans le cancer de la vessie (446). Par contre, nos résultats n'ont montré aucun rôle pour ce site dans la répression du promoteur de HYAL-1. En effet, les expériences de gènes rapporteurs à la luciférase effectuées dans les cellules ER (-), les HEK-293T après expression ectopique d'ER α , ont révélé que la délétion du Sp-1 -1020 altère l'effet répresseur de l'estrogène sur HYAL-1, la délétion du Sp-1 -1020 et du ERE-900 a aboli complètement aussi bien l'effet dû à l'expression ectopique d'ER α et au traitement avec E2 tant que la mutation du ERE-900 a le même effet que la délétion des deux sites. Ceci suggère que les deux sites Sp-1 -1020 et ERE-900 sont importants, mais que c'est plutôt le ERE-900 qui joue un rôle prédominant dans la répression de HYAL-1 par ER α en réponse à E2 puisque dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et BT-474, la délétion du Sp-1 -1020 n'a pas affecté la répression de HYAL-1 à l'inverse de la mutation du ERE-900 qui l'a complètement aboli.

Cet aspect n'est pas commun à tous les gènes cibles régulés négativement par ER α puisque ceux qui le sont indirectement via les Sp-1, dans la plupart des cas (n'ont pas de EREs sur leur

promoteur) et la répression ne requièrent pas en plus de liaison directe à l'ADN via les EREs (467, 469, 470). Tant que pour d'autres la répression se fait par interaction directe aux EREs seulement (455, 468). L'implication des deux sites n'est pas unique à HYAL-1, et ressemble à ce qui a été décrit pour le promoteur de cycline G2. Dans cette étude, ER α est recruté sur le Sp-1 et le demi-ERE du promoteur de cycline G2 où le Sp-1 est plus impliqué dans la répression basale du promoteur de cycline G2 alors que le ERE sert à la répression en réponse à l'estrogène (454).

6.2 Identification d'un nouveau corépresseur des ERs, TAL1 : de facteur hématopoïétique à répresseur de l'activité des ERs

Comme cela a été expliqué précédemment (Section 3.4), suite à leur stimulation par l'hormone, les récepteurs des estrogènes vont se lier sur le promoteur de leurs gènes cibles au niveau des séquences EREs et initier toute une cascade d'événements dont le résultat final sera l'activation ou la répression des gènes cibles. Ces événements incluent le recrutement des corégulateurs, coactivateurs ou corépresseurs incluant ceux qui possèdent (ou recrutent) des activités enzymatiques capables de modifier la chromatine telles que les acétylases et les méthylases qui vont remodeler la chromatine et modifier les histones pour rendre l'ADN accessible ou non à la machinerie transcriptionnelle. Ces mêmes coactivateurs et corépresseurs recrutés par les ERs pour réguler l'expression de leurs gènes cibles sont aussi responsables de la régulation de l'activité transcriptionnelle des ERs. En effet, en plus d'être régulée par l'hormone et les modifications post-traductionnelle, l'activité des récepteurs des estrogènes est aussi influencée par les corégulateurs. La majorité des facteurs interagissant avec les récepteurs

nucléaires ont été identifiés en utilisant le LBD comme appât. C'est pourquoi le domaine AF-2 était considéré comme étant le domaine le plus important dans le recrutement des cofacteurs. Plus tard, il a été démontré que la phosphorylation des ERs en réponse à la signalisation intracellulaire pouvait aussi affecter leur activité transcriptionnelle en modulant leur interaction avec des corégulateurs. Notre laboratoire a démontré que dans les cellules cancéreuses mammaires, la phosphorylation de résidus situés dans la région N-terminale d'ER β augmente l'interaction de ce récepteur avec SRC-1 et CBP (142), tandis qu'une phosphorylation d'un résidu situé dans la région charnière d'ER β par la kinase Akt entraîne le recrutement du coactivateur CBP (191). Quant à ER α , sa phosphorylation sur la serine 118 engendre une diminution de l'interaction avec le corépresseur SMRT (152). Cette modification post-traductionnelle est également requise pour l'interaction de la région N-terminale d'ER α avec le coactivateur p68 (480). Dans le but d'identifier de nouveaux corégulateurs des ERs, nous avons effectué un criblage d'interaction de type protéine-protéine à partir d'une banque d'expression phagique en utilisant la partie AF-1 d'ER β phosphorylé par la kinase Erk1. Ceci a mené à l'identification du facteur de transcription hématopoïétique TAL1 comme nouveau partenaire des ERs.

6.2.1 Interaction entre TAL1 et les ERs

TAL1 semble être un corépresseur atypique. En effet, il est différent des corépresseurs REA, RIP140, ou encore LCoR, qui sont recrutés de façon estrogène-dépendante (154, 155, 158, 481). Il ressemblerait plus au NCoR et SMRT (lorsqu'ils sont recrutés sur leurs récepteurs TR et RAR, respectivement (146, 147)), qui sont aussi recrutés en absence de ligand, mais contrairement à eux, TAL1 ne se dissocie pas complètement suivant la liaison de l'estrogène et on observe plutôt une diminution de l'interaction avec les ERs. D'un point de vue structural,

TAL1 ne possède pas le motif LXXLL caractéristique de certains corépresseurs. Cependant, ce motif n'est pas toujours requis pour l'interaction comme c'est le cas du REA qui possède ce motif, mais il n'est pas impliqué dans l'interaction avec ER α (154).

6.2.2 Impact de TAL1 sur l'activité transcriptionnelle des ERs

En plus d'être des partenaires d'interaction, nos résultats montrent que TAL1 et ER α sont co-exprimés dans les mêmes lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et BT474 et dans la lignée cancéreuse ovarienne OVCAR-3 qui sont ER (+). Tant que les lignées ER (-) MCF-10A et HEC-1 A expriment peu ou pas de TAL1. Ceci suggère que TAL1 pourrait être un important régulateur de l'activité transcriptionnelle des récepteurs des estrogènes. En effet, nous démontrons que TAL1 réprime l'activité transcriptionnelle E2-dépendante et -indépendante d'ER α ainsi que la réponse de certains de ses gènes cibles à l'estrogène.

Notre étude est la première à démontrer une interaction entre les ERs et TAL1. D'un point de vue fonctionnel, les récepteurs des estrogènes et TAL1 semblent avoir des fonctions physiologiques opposées durant l'hématopoïèse. TAL1 est connu pour son rôle crucial dans la différenciation des cellules souches hématopoïétiques pour former les différentes lignées cellulaires érythrocytaires, mégacaryocytaires et mastocytaires (409, 410, 482), tandis que les ERs semblent jouer un rôle inverse. En effet, la surexpression d'ER α dans des lignées érythroïdes a révélé que l'activation d'ER α par l'hormone entraîne l'arrêt de la différenciation et réprime l'expression de gènes érythrocytaires normalement induits durant la différenciation érythroïde tels que GATA1 et TAL1 (483, 484). Dans les lignées exprimant ER α , ce dernier forme un complexe avec le facteur de transcription érythroïde GATA1. Cette interaction est ligand-dépendante et régule négativement l'activité transcriptionnelle de GATA1 (485).

Toutefois, ces études ont été réalisées dans un contexte hématopoïétique, et notre étude met en évidence un rôle pour TAL1 dans les lignées cancéreuses mammaires. Dans les T-ALL, TAL1 est un oncogène et ER α l'est aussi dans le cancer du sein. Ce rôle oncogénique de TAL1 est dû au fait de son activation aberrante dans les T-ALL en raison de translocations chromosomiques alors qu'il est normalement absent durant la lymphopoïèse T normale (369). Il serait donc nécessaire d'évaluer le niveau d'expression de TAL1 dans les tissus mammaires sains afin de déterminer si sa présence dans le cancer du sein est due à une expression normale dans ce tissu ou bien elle serait due à une expression anormale.

6.2.3 Mécanisme d'action de TAL1

Pour la répression d'ER α en réponse à l'estrogène, on observe que malgré le fait que le traitement à l'estrogène diminue l'interaction entre ER α et TAL1, ce dernier continue de réprimer l'activité transcriptionnelle d'ER α . Comment donc ce corépresseur peut-il exercer cet effet alors qu'en principe il interagit moins avec ER α ? Le recrutement d'ER α sur le promoteur de ses gènes cibles ne change pas après la déplétion de TAL1, ce qui indique que TAL1 n'affecte pas le recrutement d'ER α et exclue donc une diminution du recrutement d'ER α comme mécanisme possible de la répression par TAL1.

On sait que d'une part le traitement à l'estrogène entraîne le recrutement de coactivateurs et d'autre part que TAL1 est toujours présent, mais moindrement. Tout comme d'autres corépresseurs tels que REA et le RIP140 (154, 481), en restant toujours accroché à ER α , TAL1 pourrait être impliqué dans la régulation de la transcription en cachant des sites pour certains coactivateurs et empêcher l'accès complet de ces coactivateurs pour la liaison sur les ERs. De ce fait, le traitement à l'estrogène diminue le recrutement de TAL1 sur ER α permettant ainsi le

recrutement partiel de coactivateurs et la réponse estrogénique des gènes cibles que l'on connaît. Ce n'est qu'en absence de TAL1 après sa déplétion qu'on observe une réponse optimale à l'estrogène des gènes cibles. En accord avec cette hypothèse, nous observons une augmentation de la marque active H3K27ac et une diminution de la marque répressive la H3K27me3 sur le promoteur des gènes cibles pS2, PgR et SDF-1 en réponse à E2 sans pour autant affecter le recrutement d'ER α aux promoteurs. De plus, nos résultats d'essais luciférases en présence ou en absence de TAL1 montrent qu'effectivement, la coactivation induite par SRC-1 et CBP est plus importante après la déplétion de TAL1. TAL1 permettrait ainsi de modérer la réponse estrogénique des gènes cibles d'ER α .

Même lorsqu'ER α est activé par phosphorylation induite par les MAPKs, le récepteur requiert la présence de coactivateurs. Cependant, la coactivation d'ER α par SRC-1 ou CBP en réponse à la phosphorylation ne change pas après la déplétion de TAL1, ce qui indique qu'un mécanisme d'action autre que la compétition avec les coactivateurs serait derrière la répression d'ER α en réponse à l'activation par les MAPKs.

En ce qui concerne l'effet de TAL1 sur la réponse d'ER α à la phosphorylation induite par les MAPKs, on assiste à une augmentation du recrutement de TAL1 accompagnée par la répression de la réponse d'ER α . La seule différence entre les deux voies c-à-d l'activation E2-dépendante et -indépendante est qu'avec RasV12, on active non seulement ER α , mais aussi TAL1. Ceci suggère qu'il existe deux mécanismes de répression d'ER α par TAL1 dépendamment de l'activation de ce dernier. L'impact de la phosphorylation des ERs sur le recrutement des corépresseurs n'a pas été étudié, la plupart des travaux se sont concentrés sur leur effet sur la réponse à l'estrogène. Néanmoins, selon des études antérieures, la répression transcriptionnelle par les corépresseurs NCoR et SMRT est régulée par des modifications post-

traductionnelle (486). Le corépresseur SMRT est la cible de phosphorylation par la protéine kinase CK2 et la MAP kinase ERK-2, ce qui stabilise son interaction avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne et augmente son activité répressive (487, 488). À l'inverse, la phosphorylation de SMRT par les kinases IKK α et Cdk2 en réponse à divers stimuli conduit à son exportation du noyau et à la dégradation médiée par le protéasome, réduisant ainsi son activité répressive (489, 490). La phosphorylation de NCoR par PKA sur la serine 70 augmente sa translocation dans le noyau, mais surtout potentialise sa fonction répressive sur le récepteur des androgènes dans les cellules cancéreuses de la prostate (491). De la même façon, la sumoylation de NCoR sur les lysines 152, 1117 et 1330 en présence de Ubc-9 augmente son activité répressive (492).

TAL1 aussi peut être phosphorylé sur un résidu thréonine 90 par AKT, sur un résidu serine 122 par la kinase Erk1 et enfin sur la serine 172 par PKA (393, 394, 397). Nos résultats démontrent que c'est la phosphorylation de TAL1 par PKA sur la serine 172 qui augmente le recrutement de TAL1 sur ER α et est aussi responsable de l'effet répresseur. Durant l'hématopoïèse normale et la leukémogénèse, la phosphorylation de TAL1 par PKA sur la serine 172 déstabilise son interaction avec la démethylase LSD1, ce qui a pour effet d'abolir la répression des gènes cibles réprimés par TAL1/LSD1(396). On sait aussi que TAL1 et LSD1 sont présent dans le même complexe protéique (436). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, LSD1 est plutôt associé à l'activation des gènes cibles d'ER α en réponse à l'estrogène (493). Ainsi, il se pourrait que la phosphorylation de TAL1 entraîne la dissociation de LSD1, accompagnée du recrutement favorisé de TAL1 que l'on a observé en réponse aux MAPKs et de ce fait induit la répression de l'activité transcriptionnelle d'ER α et de ces gènes cibles. En raison de son recrutement augmenté en réponse à la phosphorylation, TAL1 pourrait

aussi tout simplement réprimer l'activité d'ER α en recrutant à son tour plus de HDACs ou bien d'autres corépresseurs qui vont alors condenser la chromatine et restreindre de ce fait l'accessibilité à la machinerie transcriptionnelle.

6.2.4 Rôle de TAL1 dans le cancer du sein

Quel rôle joue cet oncogène dans le cancer du sein ? En plus de son implication dans l'hématopoïèse normale, TAL1 est connu et a surtout été étudié pour son rôle crucial dans la leukémogénèse, il a d'ailleurs été identifié initialement chez un patient atteint de leucémie lymphoblastique aiguë des cellules T (T-ALL) où il est exprimé de façon aberrante (365-367). Le rôle de TAL1 dans les leucémies T-ALL est associé à un pouvoir prolifératif. Il a ainsi été démontré que l'expression ectopique de TAL1 dans les lignées leucémiques a un effet prolifératif et anti-apoptotique (494). À l'inverse, sa déplétion dans les T-ALL diminue la prolifération en induisant un arrêt partiel du cycle cellulaire en phase G2/M. Les analyses d'expression de gènes suite à la déplétion de TAL1 ont révélé que la déplétion de TAL1 affecte l'expression de nombreux gènes qui sont soit augmentés ou diminués. Parmi ces gènes, NKX.3 (un gène activé par TAL1 et qui est requis pour la prolifération des lignées T-ALL (495). Également, la déplétion de TAL1 dans les monocytes/macrophages dérivants de la moelle osseuse inhibe la prolifération et diminue l'entrée en phase G1/S (496). Par ailleurs, en s'hetérodimerisant avec les protéines E, TAL1 inhibe leur activité transcriptionnelle et de ce fait inhibe aussi l'expression de leurs gènes cibles. Parmi lesquels, on retrouve les suppresseurs de tumeurs p21 (497-499) et p16 (419, 500), d'importants régulateurs du cycle cellulaire positivement régulé par les protéines E. Nos résultats montrent le contraire, à savoir que TAL1 inhibe la prolifération de la lignée cancéreuse MCF-7 en réponse à l'estrogène. Dans le cancer du sein, ER α est connu pour son effet prolifératif en activant des gènes cibles tels que c-Myc et

Cyclin D1 entre autres (215, 216, 218). L'analyse de l'expression de quelques gènes cibles d'ER α en réponse à l'estrogène après déplétion de TAL1 montre que les gènes c-Myc et Cyclin D1 ne sont pas affectés. Parmi les gènes inhibés par TAL1, pS2, PgR, mais surtout SDF-1 est intéressant, car il code pour la chimiokine SDF-1 qui en se liant au récepteur à chimiokine CXCR4 promeut la prolifération cellulaire (192). Il semble donc que l'effet de prolifératif ou antiprolifératif de TAL1 dépend des gènes cibles qu'il régule.

La progression tumorale est aussi caractérisée par le passage des cellules cancéreuses d'un phénotype épithelial vers un phénotype mésenchymateux. Ce processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est le résultat d'une altération de l'expression de certains gènes, notamment une diminution des marqueurs épithéliaux tels que les E-cadhérines, et une augmentation des marqueurs mésenchymateux tels que les Vimentines (501-503). Nos résultats montrent les mêmes changements dans les MCF-7 en réponse à l'estrogène, avec une régulation positive du gène Vimentine, en accord avec l'effet connu des estrogènes pour induire la TEM dans les cellules cancéreuses mammaires (479, 504-506). De façon similaire, l'expression du gène CDH2 qui code pour la N-cadhérine, aussi un marqueur mésenchymateux, était augmenté dans les cellules traitées à l'estrogène (507, 508). Fait intéressant, nos résultats montrent que ces changements de l'expression des marqueurs MET sont dépendant de TAL1, puisque sa déplétion augmente leurs réponses à l'estrogène. De plus, le gène cible d'ER α , SDF-1 stimule aussi la TEM en augmentant l'expression de vimentine et CDH2 et en diminuant celle des E-Cadhérines (509). De ce fait, comme TAL1 inhibe l'expression de SDF-1, en absence de TAL1 l'expression de SDF-1 augmente et celle des marqueurs mésenchymateux aussi. Ce qui suggère un rôle clé pour TAL1 dans le maintien d'une régulation adéquate des marqueurs mésenchymateux en inhibant la migration des cellules cancéreuses mammaires. Le rôle de

TAL1 dans la migration a été très peu étudié, on sait néanmoins que dans les cellules endothéliales, l'expression ectopique de TAL1 inhibe la migration cellulaire (510). Une autre étude a démontré que cet effet était en fait dû à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion VE-Cadhérines par TAL1 (511).

Perspectives

Étudier le potentiel de HYAL-1 en tant que biomarqueur et cible thérapeutique

Dans le premier volet de notre étude, on s'est intéressé à la régulation du gène de la hyaluronidase HYAL1 par ER α . Nous démontrons que dans les tumeurs cancéreuses mammaires ER (+), l'estrogène diminue l'expression de HYAL-1, et que les lignées cancéreuses mammaires ER (-) expriment des niveaux élevés de HYAL1. Cette corrélation inverse est observée aussi bien dans les échantillons de patientes atteintes de cancer du sein (notre étude), mais aussi dans des échantillons de cancer épithelial de l'ovaire (444). Ces tumeurs ER (-) sont connues pour leur caractère malin et agressif et sont associées à un faible pronostique, car elles ne peuvent être traitées avec les anti-estrogènes. L'identification de la hyaluronidase HYAL1 comme étant réprimé par ER α et l'estrogène, suggère que dans ces tumeurs-là c'est la perte/absence d'ER α qui induit une augmentation de l'expression de HYAL1. Dans ce sens, HYAL1 pourrait être utilisé comme un biomarqueur pour les tumeurs ER (-). Par exemple, les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (qui n'exprime pas les récepteurs hormonaux) comme la lignée MDA-MB-231 ne peuvent bénéficier de l'hormonothérapie et sont

traitées avec la chimiothérapie. Dans le cas du cancer épithéial de l'ovaire (CÉO) aussi, HYAL1 pourrait être utilisé seul ou en combinaison avec le biomarqueur conventionnel CA125 déjà utilisé, mais qui ne permet pas de détecter tous les types du cancer de l'ovaire (512). Nos résultats précédents avec des échantillons de plasma de patientes atteintes de cancer de l'ovaire indiquent un réel potentiel pour la mesure de l'activité plasmatique de HYAL-1 (444). Résultats qui sont en accord avec ce qui est connu dans la littérature, à savoir que des niveaux élevés de HYAL-1 retrouvés dans les urines de patients atteints de cancer de la vessie, et dans la salive de patients avec cancers de la tête et du cou et sont utilisés comme biomarqueur (331, 337, 357). Les résultats obtenus vont nous permettre de déterminer l'utilité de HYAL-1 comme prédicteur de la survie et/ou un biomarqueur pour la détection des CÉO. Sachant que seul 20-30 % de patientes avec CÉO à cellules claires ou mucineuses présentent un niveau élevé du marqueur CA 125, l'utilisation de HYAL-1 comme marqueur pour ces deux sous types et pour les cancers du sein ER (-) améliorera certainement la capacité de détection de ces cancers. À long terme HYAL1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de cancers ER (-). Un inhibiteur de l'activité de HYAL1 a d'ailleurs été développé récemment et les résultats obtenus sur le cancer de la vessie et de la prostate sont très prometteurs (364, 513).

Implication de TAL1 dans la résistance aux traitements

La phosphorylation des ERs est un mécanisme essentiel pour l'activation transcriptionnelle ligand-indépendante des gènes cibles dans le cancer du sein (514). En effet, les ERs peuvent être stimulés par une variété de facteurs de croissance et d'autres signaux induits par les kinases et mimant les effets de l'estrogène sur l'expression de gènes impliqués dans la

croissance cellulaire et la prolifération du cancer du sein et ce indépendamment d'un signal hormonal. Ainsi, la signalisation induite par les récepteurs des facteurs de croissance, notamment les membres de la famille EGFR / ErbB, est associée à la résistance à la thérapie endocrinienne (514-516). Par conséquent, l'activation accrue de la voie MAPK / Erk est récurrente dans les cellules cancéreuses ER (+) et dans les tumeurs de patientes traitées au tamoxifène (258, 517). Étant donné que nos résultats démontrent que TAL1 régule négativement la transcription basale d'ER α ainsi que la réponse à l'activation par les MAPKs, il est possible que l'expression altérée de TAL1 et / ou de son activité répressive puissent favoriser le développement de tumeur et la résistance à l'hormonothérapie. En effet, il est connu que dans les lignées résistantes aux thérapies endocriniques, le niveau d'expression des corépresseurs diminue et ceux des coactivateurs augmentent. Il serait donc nécessaire de mettre en évidence le rôle de TAL1 dans des cellules cancéreuses qui ne répondent plus aux anti-estrogènes. TAL1 pourrait ainsi être inactivé ou moins exprimé dans ces tumeurs résistantes, pour tester cette hypothèse, il faudra comparer les niveaux d'expression de TAL1 dans les lignées cancéreuses résistantes ou non au tamoxifène. D'autres études seront certainement nécessaires pour déterminer si des altérations moléculaires de TAL1 sont en corrélation avec le développement du cancer du sein.

Dans les tissus hématopoïétiques sains et leucémiques, il est connu que TAL1 exerce son action répressive en interagissant avec plusieurs partenaires. Ainsi pour mieux comprendre le mode d'action de TAL1 dans les lignées cancéreuses mammaires, il est important de déterminer le complexe protéique associé à TAL1 en réponse à l'estrogène et à la phosphorylation, ceci permettra aussi de différencier les deux mécanismes d'action. Est-ce que TAL1 forme un complexe avec les mêmes partenaires hématopoïétiques ? Certains d'entre eux comme

GATA1/3, LSD, LDB1 sont aussi exprimés dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 (493, 518, 519).

Conclusion

Du fait de son implication dans le cancer du sein, le récepteur des estrogènes ER α est une cible importante des thérapies anti-cancéreuses. En étant amplifié dans 2/3 des tumeurs mammaires, il permet le traitement de ces dernières par thérapie anti-estrogénique. Néanmoins, des traitements plus efficaces et plus confortables pour les patients restent nécessaires et font partie des priorités de la communauté scientifique et des gouvernements. Il est donc indispensable d'avoir une meilleure compréhension des différents mécanismes d'action des ERs afin de pouvoir les utiliser à des fins thérapeutiques. Notre première étude nous a permis d'identifier un nouveau gène cible réprimé par ER α . Nous pensons que la répression des gènes par ER α en réponse à l'estrogène est une voie de régulation critique dans les cellules ER (+), et que la dérégulation de cette répression notamment dans les cancers ER (-) pourrait avoir des effets dramatiques sur le développement et la progression tumorale. Notre deuxième but visait à identifier un partenaire d'interaction pour les ERs. En identifiant TAL1 comme corépresseur de l'activité des ERs, cette étude est une des premières étapes vers la compréhension des mécanismes par lesquels les corépresseurs atténuent la réponse E2-dépendante des gènes cibles, mais aussi E2-indépendante en réponse aux MAPKs qui était jusqu'à présent peu connue. En plus d'avoir identifié un nouveau corépresseur des ERs, nous avons mis en évidence un rôle

inattendu pour ce facteur de transcription hématopoïétique TAL1 dans le cancer du sein. Il serait intéressant dans le futur d'investiguer le rôle qu'il pourrait avoir dans le tissu mammaire sain.

Bibliographie

1. Hulka BS. Epidemiology of susceptibility to breast cancer. *Prog Clin Biol Res.* 1996;395:159-74.
2. de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet.* 2002;39(4):225-42.
3. Parkin DM. International variation. *Oncogene.* 2004;23(38):6329-40.
4. Robert SA, Strombom I, Trentham-Dietz A, Hampton JM, McElroy JA, Newcomb PA, et al. Socioeconomic risk factors for breast cancer: distinguishing individual- and community-level effects. *Epidemiology.* 2004;15(4):442-50.
5. Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(22):1819-27.
6. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Hennekens CH, Speizer FE. Moderate alcohol consumption and the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 1987;316(19):1174-80.
7. Zheng W, Gustafson DR, Sinha R, Cerhan JR, Moore D, Hong CP, et al. Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(22):1724-9.
8. MacMahon B, Cole P, Brown J. Etiology of human breast cancer: a review. *J Natl Cancer Inst.* 1973;50(1):21-42.
9. Trichopoulos D, MacMahon B, Cole P. Menopause and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1972;48(3):605-13.
10. Key TJ, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24(1):29-43.
11. Josephy PD. Re: Feigelson, H.S. and Henderson, B.E. (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis,* 17, 2279-2284. *Carcinogenesis.* 1997;18(9):1859-60.
12. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2006;354(3):270-82.
13. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006;102(1-5):89-96.
14. Poutanen M, Isomaa V, Peltoketo H, Vihko R. Regulation of oestrogen action: role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Ann Med.* 1995;27(6):675-82.
15. Ghayee HK, Auchus RJ. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(4):289-300.
16. Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Semin Reprod Med.* 2004;22(4):337-47.
17. Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;228(1-2):67-78.
18. Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Jones M, et al. The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends in endocrinology and metabolism:* TEM. 2000;11(5):184-8.
19. Clarke R. Introduction and overview: sex steroids in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000;5(3):245-50.

20. Gooren LJ, Toorians AW. Significance of oestrogens in male (patho)physiology. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2003;64(2):126-35.
21. Porter JC. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *J Invest Dermatol*. 1974;63(1):85-92.
22. Lau KM, Mok SC, Ho SM. Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5722-7.
23. Naftolin F, Garcia-Segura LM, Keefe D, Leranth C, Maclusky NJ, Brawer JR. Estrogen effects on the synaptology and neural membranes of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Biol Reprod*. 1990;42(1):21-8.
24. Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J Neurobiol*. 1999;40(4):574-84.
25. Woolley CS, Weiland NG, McEwen BS, Schwartzkroin PA. Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci*. 1997;17(5):1848-59.
26. Li R, Shen Y. Estrogen and brain: synthesis, function and diseases. *Front Biosci*. 2005;10:257-67.
27. Yue X, Lu M, Lancaster T, Cao P, Honda S, Staufenbiel M, et al. Brain estrogen deficiency accelerates Abeta plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):19198-203.
28. Turner RT, Kidder LS, Zhang M, Harris SA, Westerlind KC, Maran A, et al. Estrogen has rapid tissue-specific effects on rat bone. *J Appl Physiol* (1985). 1999;86(6):1950-8.
29. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*. 2002;57:385-409.
30. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med*. 1997;186(4):489-95.
31. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):3128-35.
32. Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation*. 1997;95(1):252-64.
33. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res*. 2002;90(4):413-9.
34. Bush TL. The epidemiology of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;592:263-71; discussion 334-45.
35. Schaefer EJ, Foster DM, Zech LA, Lindgren FT, Brewer HB, Jr., Levy RI. The effects of estrogen administration on plasma lipoprotein metabolism in premenopausal females. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;57(2):262-7.
36. Nandi S, Guzman RC, Yang J. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3650-7.
37. Ziel HK, Finkle WD. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med*. 1975;293(23):1167-70.
38. Feigelson HS, Henderson BE. Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*. 1996;17(11):2279-84.

39. Grady D, Ernster VL. Hormone replacement therapy and endometrial cancer: are current regimens safe? *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(15):1088-9.
40. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;50(1):3-22.
41. Jacobson HI, Gupta GN, Fernandez C, Hennix S, Jensen EV. Determination of tritium in biological material. *Arch Biochem Biophys.* 1960;86:89-93.
42. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;55(6):1574-81.
43. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):7889-93.
44. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986;231(4742):1150-4.
45. Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):5925-30.
46. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996;392(1):49-53.
47. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol.* 1997;11(3):353-65.
48. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine.* 2006;27(4):299-402.
49. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science.* 1989;244(4900):76-9.
50. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F. Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol.* 2001;15(12):2057-63.
51. Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F. Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):821-31.
52. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, et al. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* 2000;19(17):4688-700.
53. Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, et al. The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146(12):5474-84.
54. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336(4):1023-7.
55. Wang Y, Miksicek RJ. Identification of a dominant negative form of the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 1991;5(11):1707-15.
56. Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev.* 2004;25(6):869-98.
57. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, et al. Expression of wild-type estrogen receptor beta and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer research.* 1999;59(21):5425-8.

58. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(1):75-8.
59. Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hayashi S. Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbetacx/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7. *Oncogene.* 2003;22(32):5011-20.
60. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(15):3505-12.
61. Davies MP, O'Neill PA, Innes H, Sibson DR, Prime W, Holcombe C, et al. Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *J Mol Endocrinol.* 2004;33(3):773-82.
62. Thomas C, Gustafsson J-Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2011;11(8):597-608.
63. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol.* 2003;17(1):1-10.
64. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids.* 1999;64(5):310-9.
65. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* 1987;51(6):941-51.
66. Mader S, Chambon P, White JH. Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(5):1125-32.
67. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 8):1253-61.
68. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(10):381-8.
69. Skafar DF, Zhao C. The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine.* 2008;33(1):1-8.
70. Nichols M, Rientjes JM, Stewart AF. Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J.* 1998;17(3):765-73.
71. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997;389(6652):753-8.
72. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* 1998;12(21):3343-56.
73. Ylikomi T, Wurtz JM, Syvala H, Passinen S, Pekki A, Haverinen M, et al. Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998;33(6):437-66.
74. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev.* 1997;18(3):306-60.

75. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol.* 2004;33(2):387-410.
76. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:451-86.
77. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol.* 1997;19(3):207-26.
78. Seiler-Tuyns A, Walker P, Martinez E, Merillat AM, Givel F, Wahli W. Identification of estrogen-responsive DNA sequences by transient expression experiments in a human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res.* 1986;14(22):8755-70.
79. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell.* 1986;46(7):1053-61.
80. Anolik JH, Klinge CM, Bambara RA, Hilf R. Differential impact of flanking sequences on estradiol- vs 4-hydroxytamoxifen-ligated estrogen receptor binding to estrogen responsive element DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;46(6):713-30.
81. Berry M, Nunez AM, Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(4):1218-22.
82. Augereau P, Miralles F, Cavailles V, Gaudelet C, Parker M, Rochefort H. Characterization of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Mol Endocrinol.* 1994;8(6):693-703.
83. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(14):2905-19.
84. Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature.* 1989;338(6212):271-4.
85. Watanabe T, Inadomi Y, Fukuzawa K, Nakano T, Tanaka S, Nilsson L, et al. DNA and estrogen receptor interaction revealed by fragment molecular orbital calculations. *J Phys Chem B.* 2007;111(32):9621-7.
86. Fryer CJ, Archer TK. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature.* 1998;393(6680):88-91.
87. Yoshinaga SK, Peterson CL, Herskowitz I, Yamamoto KR. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science.* 1992;258(5088):1598-604.
88. Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, Nakajima T, Schulman IG, Jugulon H, et al. Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature.* 1996;383(6595):99-103.
89. Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 1996;85(3):403-14.
90. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, et al. Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science.* 1999;284(5423):2174-7.
91. Fondell JD, Brunel F, Hisatake K, Roeder RG. Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):281-7.

92. Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Naar AM, et al. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature*. 1999;398(6730):824-8.
93. Reinberg D, Orphanides G, Ebright R, Akoulitchev S, Carcamo J, Cho H, et al. The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1998;63:83-103.
94. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*. 2003;115(6):751-63.
95. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*. 2000;103(6):843-52.
96. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiu AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;74(5):311-7.
97. Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(4):1073-89.
98. Batistuzzo de Medeiros SR, Krey G, Hihi AK, Wahli W. Functional interactions between the estrogen receptor and the transcription activator Sp1 regulate the estrogen-dependent transcriptional activity of the vitellogenin A1 promoter. *J Biol Chem*. 1997;272(29):18250-60.
99. Safe S, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J Mol Endocrinol*. 2008;41(5):263-75.
100. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev*. 2008;28(6):954-74.
101. Quaedackers ME, van den Brink CE, van der Saag PT, Tertoolen LG. Direct interaction between estrogen receptor alpha and NF-kappaB in the nucleus of living cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2007;273(1-2):42-50.
102. Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*. 1997;11(11):1569-80.
103. Rishi AK, Shao ZM, Baumann RG, Li XS, Sheikh MS, Kimura S, et al. Estradiol regulation of the human retinoic acid receptor alpha gene in human breast carcinoma cells is mediated via an imperfect half-palindromic estrogen response element and Sp1 motifs. *Cancer Res*. 1995;55(21):4999-5006.
104. Vyhlidal C, Samudio I, Kladde MP, Safe S. Transcriptional activation of transforming growth factor alpha by estradiol: requirement for both a GC-rich site and an estrogen response element half-site. *J Mol Endocrinol*. 2000;24(3):329-38.
105. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, et al. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4658-62.
106. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science*. 1999;286(5443):1358-62.
107. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem*. 2001;276(13):9817-24.

108. Amit I, Wides R, Yarden Y. Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol.* 2007;3:151.
109. Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell.* 1995;80(2):199-211.
110. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999;20(3):321-44.
111. Szego CM, Davis JS. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967;58(4):1711-8.
112. Farhat MY, Abi-Younes S, Dingaan B, Vargas R, Ramwell PW. Estradiol increases cyclic adenosine monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276(2):652-7.
113. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22278-88.
114. Zhang Z, Kumar R, Santen RJ, Song RX. The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action. *Steroids.* 2004;69(8-9):523-9.
115. Smotrys JE, Linder ME. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:559-87.
116. Acconia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell.* 2005;16(1):231-7.
117. Adlanmerini M, Solinhac R, Abot A, Fabre A, Raymond-Letron I, Guihot AL, et al. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor alpha in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(2):E283-90.
118. Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene.* 2004;23(48):7979-89.
119. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14783-8.
120. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 2005;16(8):347-53.
121. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 2000;407(6803):538-41.
122. Sotgia F, Rui H, Bonuccelli G, Mercier I, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1, mammary stem cells, and estrogen-dependent breast cancers. *Cancer Res.* 2006;66(22):10647-51.
123. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohe C. Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(24):18447-53.
124. Song RX, Chen Y, Zhang Z, Bao Y, Yue W, Wang JP, et al. Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118(4-5):219-30.
125. Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ERalpha-Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 2002;16(1):116-27.

126. Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, et al. Direct interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 2007;21(6):1370-80.
127. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol*. 2005;19(4):833-42.
128. Bjornstrom L, Sjoberg M. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept*. 2004;2(1):3.
129. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev*. 2011;32(5):597-622.
130. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
131. Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(5):403-10.
132. Naar AM, Lemon BD, Tjian R. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:475-501.
133. Zwart W, Theodorou V, Kok M, Canisius S, Linn S, Carroll JS. Oestrogen receptor-co-factor-chromatin specificity in the transcriptional regulation of breast cancer. *EMBO J*. 2011.
134. Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science*. 1994;264(5164):1455-8.
135. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*. 1995;270(5240):1354-7.
136. Anzick SL, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, et al. AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*. 1997;277(5328):965-8.
137. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 1997;387(6634):733-6.
138. Chen D, Huang SM, Stallcup MR. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem*. 2000;275(52):40810-6.
139. Stallcup MR, Chen D, Koh SS, Ma H, Lee YH, Li H, et al. Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochem Soc Trans*. 2000;28(4):415-8.
140. Hall JM, McDonnell DP. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*. 2005;5(6):343-57.
141. Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, et al. Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*. 1998;12(10):1605-18.
142. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell*. 1999;3(4):513-9.
143. Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001;77(1):19-27.
144. Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, et al. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*. 1999;97(1):17-27.

145. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*. 2008;22(2):317-30.
146. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*. 1995;377(6548):454-7.
147. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.
148. Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 1999;402(6757):93-6.
149. Hu X, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2000;11(1):6-10.
150. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002;295(5564):2465-8.
151. Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol*. 1997;11(6):693-705.
152. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, et al. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(6):2920-5.
153. Jepsen K, Hermanson O, Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEvilly RJ, et al. Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell*. 2000;102(6):753-63.
154. Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem*. 2000;275(46):35848-56.
155. Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):6947-52.
156. Castet A, Boulahtouf A, Versini G, Bonnet S, Augereau P, Vignon F, et al. Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(6):1957-66.
157. Wei LN, Hu X, Chandra D, Seto E, Farooqui M. Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem*. 2000;275(52):40782-7.
158. Fernandes I, Bastien Y, Wai T, Nygard K, Lin R, Cormier O, et al. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell*. 2003;11(1):139-50.
159. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001;81(4):1535-65.
160. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):542-54.

161. Mann M, Ong SE, Gronborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.* 2002;20(6):261-8.
162. Denu JM, Stuckey JA, Saper MA, Dixon JE. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell.* 1996;87(3):361-4.
163. Yart A, Chap H, Raynal P. Phosphoinositide 3-kinases in lysophosphatidic acid signaling: regulation and cross-talk with the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582(1-3):107-11.
164. Smith FD, Langeberg LK, Scott JD. Plugging PKA into ERK scaffolds. *Cell Cycle.* 2011;10(5):731-2.
165. Lu DY, Tang CH, Yeh WL, Wong KL, Lin CP, Chen YH, et al. SDF-1alpha up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. *Eur J Pharmacol.* 2009;613(1-3):146-54.
166. Tremblay CL, Kollmann C, Giguel F, Chou TC, Hirsch MS. Strong in vitro synergy between the fusion inhibitor T-20 and the CXCR4 blocker AMD-3100. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2000;25(2):99-102.
167. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem.* 2005;280(38):33006-14.
168. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22296-302.
169. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J Mol Endocrinol.* 2008;40(4):173-84.
170. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science.* 1995;270(5241):1491-4.
171. Dutertre M, Smith CL. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol.* 2003;17(7):1296-314.
172. Sheeler CQ, Singleton DW, Khan SA. Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr Res.* 2003;29(2):237-55.
173. Chen D, Washbrook E, Sarwar N, Bates GJ, Pace PE, Thirunuvakkarasu V, et al. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene.* 2002;21(32):4921-31.
174. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell.* 2005;18(1):71-82.
175. Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM, et al. Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol.* 2003;23(17):5979-88.

176. Gonzalez L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I, Lopez E, Gonzalez JJ, Martin-Perez J, et al. Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene*. 2009;28(10):1298-308.
177. Cheng J, Zhang C, Shapiro DJ. A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor-alpha is required for down-regulation of gene expression by 17beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology*. 2007;148(10):4634-41.
178. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):1978-84.
179. Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor alpha serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett*. 2010;584(1):124-8.
180. Shah YM, Rowan BG. The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol Endocrinol*. 2005;19(3):732-48.
181. Migliaccio A, Rotondi A, Auricchio F. Estradiol receptor: phosphorylation on tyrosine in uterus and interaction with anti-phosphotyrosine antibody. *EMBO J*. 1986;5(11):2867-72.
182. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, Pagano M. Phosphorylation of uterus estradiol receptor on tyrosine. *Prog Clin Biol Res*. 1990;322:133-55.
183. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G. Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: targeting the association of Src with steroid receptors. *Steroids*. 2008;73(9-10):880-4.
184. Varricchio L, Migliaccio A, Castoria G, Yamaguchi H, de Falco A, Di Domenico M, et al. Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol Cancer Res*. 2007;5(11):1213-21.
185. Zhang QX, Borg A, Wolf DM, Oesterreich S, Fuqua SA. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 1997;57(7):1244-9.
186. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J*. 2002;21(20):5437-47.
187. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, et al. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell*. 2004;5(6):597-605.
188. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010;21(2):104-10.
189. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;94(1-3):23-37.
190. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4830-40.
191. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene*. 2013;32(1):117-26.

192. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res.* 2009;69(14):5793-800.
193. Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell.* 2005;18(1):1-12.
194. Seeler JS, Dejean A. Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(9):690-9.
195. Faus H, Haendler B. Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother.* 2006;60(9):520-8.
196. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol.* 2005;19(11):2671-84.
197. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol.* 2012;32(14):2709-21.
198. Pickart CM. Ubiquitin enters the new millennium. *Mol Cell.* 2001;8(3):499-504.
199. Roos-Mattjus P, Sistonen L. The ubiquitin-proteasome pathway. *Ann Med.* 2004;36(4):285-95.
200. Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, et al. Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell.* 2003;11(3):695-707.
201. Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, et al. Turning off estrogen receptor beta-mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol.* 2006;26(21):7966-76.
202. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Hagglad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997;138(3):863-70.
203. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 2000;24(1):145-55.
204. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4835-40.
205. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;74(5):287-96.
206. Curtis Hewitt S, Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res.* 2000;2(5):345-52.
207. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11162-6.
208. Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology.* 1998;139(12):5070-81.
209. Ogawa S, Taylor JA, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology.* 1996;64(6):467-70.
210. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15677-82.

211. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12887-92.
212. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science*. 1999;286(5448):2328-31.
213. Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, Walker VR, Gustafsson JA, Smithies O, et al. Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha/beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(26):14737-41.
214. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):561-70.
215. Watts CK, Brady A, Sarcevic B, deFazio A, Musgrove EA, Sutherland RL. Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells is associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation. *Mol Endocrinol*. 1995;9(12):1804-13.
216. Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL. Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1998;65(1-6):169-74.
217. Planas-Silva MD, Shang Y, Donaher JL, Brown M, Weinberg RA. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression. *Cancer Res*. 2001;61(10):3858-62.
218. Dubik D, Shiu RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene*. 1992;7(8):1587-94.
219. Gomez BP, Riggins RB, Shajahan AN, Klimach U, Wang A, Crawford AC, et al. Human X-box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *FASEB J*. 2007;21(14):4013-27.
220. Svtotelis A, Bianco S, Madore J, Huppe G, Nordell-Markovits A, Mes-Masson AM, et al. H3K27 demethylation by JMJD3 at a poised enhancer of anti-apoptotic gene BCL2 determines ERalpha ligand dependency. *EMBO J*. 2011;30(19):3947-61.
221. Annicotte JS, Chavey C, Servant N, Teyssier J, Bardin A, Licznar A, et al. The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene. *Oncogene*. 2005;24(55):8167-75.
222. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(20):10972-7.
223. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*. 2002;347(20):1593-603.
224. Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol*. 2003;17(3):309-17.
225. Driggers PH, Segars JH. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2002;13(10):422-7.
226. Mueck AO, Seeger H. Breast cancer: are estrogen metabolites carcinogenic? *Climacteric*. 2007;10 Suppl 2:62-5.
227. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
228. Forster C, Makela S, Warri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, et al. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15578-83.

229. Imamov O, Morani A, Shim GJ, Omoto Y, Thulin-Andersson C, Warner M, et al. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9375-80.
230. Imamov O, Lopatkin NA, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2773-4.
231. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, Salmi S, Saji S, Webster JI, et al. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6330-5.
232. Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2433-8.
233. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 2000;127(19):4277-91.
234. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, Murphy LC. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res.* 1998;58(15):3197-201.
235. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(3):537-51.
236. Faulds MH, Olsen H, Helguero LA, Gustafsson JA, Haldosen LA. Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol.* 2004;18(2):412-21.
237. Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol.* 2003;17(2):203-8.
238. Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(6):1566-71.
239. Behrens D, Gill JH, Fichtner I. Loss of tumourigenicity of stably ERbeta-transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;274(1-2):19-29.
240. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2004;64(1):423-8.
241. Anzai Y, Holinka CF, Kuramoto H, Gurpide E. Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *Cancer Res.* 1989;49(9):2362-5.
242. Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(19):1449-57.
243. O'Regan RM, Jordan VC. Tamoxifen to raloxifene and beyond. *Semin Oncol.* 2001;28(3):260-73.
244. Grese TA, Sluka JP, Bryant HU, Cullinan GJ, Glasebrook AL, Jones CD, et al. Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):14105-10.

245. Sato M, Rippy MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J.* 1996;10(8):905-12.
246. Du B, Ohmichi M, Takahashi K, Kawagoe J, Ohshima C, Igarashi H, et al. Both estrogen and raloxifene protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity in estrogen receptor alpha-transfected PC12 cells by activation of telomerase activity via Akt cascade. *J Endocrinol.* 2004;183(3):605-15.
247. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, et al. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest.* 1994;93(1):63-9.
248. Nettles KW, Greene GL. Ligand Control of Coregulator Recruitment to Nuclear Receptors. *Annual Review of Physiology.* 2005;67(1):309-33.
249. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:315-60.
250. Shiao AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell.* 1998;95(7):927-37.
251. Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antiestromonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(36):5815-24.
252. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev.* 2004;25(1):45-71.
253. McDonnell DP, Connor CE, Wijayaratne A, Chang CY, Norris JD. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:295-316.
254. Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol.* 1998;54(1):105-12.
255. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science.* 1997;277(5331):1508-10.
256. Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, et al. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5379-87.
257. Johnston SR. Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications. *Anticancer Drugs.* 1997;8(10):911-30.
258. McClelland RA, Barrow D, Madden TA, Dutkowski CM, Pamment J, Knowlden JM, et al. Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology.* 2001;142(7):2776-88.
259. Belani CP, Pearl P, Whitley NO, Aisner J. Tamoxifen withdrawal response. Report of a case. *Arch Intern Med.* 1989;149(2):449-50.
260. Gottardis MM, Jordan VC. Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration. *Cancer Res.* 1988;48(18):5183-7.

261. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, et al. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol.* 2005;23(11):2469-76.
262. Mahfoudi A, Roulet E, Dauvois S, Parker MG, Wahli W. Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(10):4206-10.
263. Fuqua SA, Wiltschke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, et al. A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res.* 2000;60(15):4026-9.
264. Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD, et al. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69(1-6):45-50.
265. Girault I, Bieche I, Lidereau R. Role of estrogen receptor alpha transcriptional coregulators in tamoxifen resistance in breast cancer. *Maturitas.* 2006;54(4):342-51.
266. Xu J, Wu RC, O'Malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(9):615-30.
267. Bouras T, Southey MC, Venter DJ. Overexpression of the steroid receptor coactivator AIB1 in breast cancer correlates with the absence of estrogen and progesterone receptors and positivity for p53 and HER2/neu. *Cancer Res.* 2001;61(3):903-7.
268. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(5):353-61.
269. Dauvois S, Danielian PS, White R, Parker MG. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(9):4037-41.
270. Howell A. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(3):689-706.
271. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie C, Labrie F, Giguere V. EM-800, a novel antiestrogen, acts as a pure antagonist of the transcriptional functions of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1998;139(1):111-8.
272. Berry NB, Fan M, Nephew KP. Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol.* 2008;22(7):1535-51.
273. Wakeling AE, Bowler J. Steroidal pure antioestrogens. *J Endocrinol.* 1987;112(3):R7-10.
274. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer.* 2004;90 Suppl 1:S2-6.
275. Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, et al. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(10):746-50.
276. Wardley AM. Fulvestrant: a review of its development, pre-clinical and clinical data. *Int J Clin Pract.* 2002;56(4):305-9.
277. Hu XF, Veroni M, De Luise M, Wakeling A, Sutherland R, Watts CK, et al. Circumvention of tamoxifen resistance by the pure anti-estrogen ICI 182,780. *Int J Cancer.* 1993;55(5):873-6.
278. Jones SE. A new estrogen receptor antagonist--an overview of available data. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;75 Suppl 1:S19-21; discussion S33-5.

279. Ali S, Buluwela L, Coombes RC. Antiestrogens and their therapeutic applications in breast cancer and other diseases. *Annu Rev Med*. 2011;62:217-32.
280. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673-84.
281. Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(4):709-22.
282. Christov K, Grubbs CJ, Shilkaitis A, Juliana MM, Lubet RA. Short-term modulation of cell proliferation and apoptosis and preventive/therapeutic efficacy of various agents in a mammary cancer model. *Clin Cancer Res*. 2007;13(18 Pt 1):5488-96.
283. Brodie A, Sabnis G, Jelovac D. Aromatase and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006;102(1-5):97-102.
284. Smith IE, Dowsett M. Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(24):2431-42.
285. Gligorov J, Pritchard K, Goss P. Adjuvant and extended adjuvant use of aromatase inhibitors: reducing the risk of recurrence and distant metastasis. *Breast*. 2007;16 Suppl 3:S1-9.
286. Kendall A, Dowsett M. Novel concepts for the chemoprevention of breast cancer through aromatase inhibition. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):827-37.
287. Buzdar AU. New generation aromatase inhibitors--from the advanced to the adjuvant setting. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;75 Suppl 1:S13-7; discussion S33-5.
288. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Mihalic K, Fan YX, Xiao W, et al. Suppression of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. *Nat Med*. 2004;10(1):40-7.
289. Mao C, Patterson NM, Cherian MT, Aninye IO, Zhang C, Montoya JB, et al. A new small molecule inhibitor of estrogen receptor alpha binding to estrogen response elements blocks estrogen-dependent growth of cancer cells. *J Biol Chem*. 2008;283(19):12819-30.
290. Wang LH, Yang XY, Zhang X, An P, Kim HJ, Huang J, et al. Disruption of estrogen receptor DNA-binding domain and related intramolecular communication restores tamoxifen sensitivity in resistant breast cancer. *Cancer Cell*. 2006;10(6):487-99.
291. Chang C, Norris JD, Gron H, Paige LA, Hamilton PT, Kenan DJ, et al. Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8226-39.
292. Hall JM, Chang CY, McDonnell DP. Development of peptide antagonists that target estrogen receptor beta-coactivator interactions. *Mol Endocrinol*. 2000;14(12):2010-23.
293. Rodriguez AL, Tamrazi A, Collins ML, Katzenellenbogen JA. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. *J Med Chem*. 2004;47(3):600-11.
294. Gunther JR, Moore TW, Collins ML, Katzenellenbogen JA. Amphiphilic benzenes are designed inhibitors of the estrogen receptor alpha/steroid receptor coactivator interaction. *ACS Chem Biol*. 2008;3(5):282-6.
295. Meyer K, Rapport MM. Hyaluronidases. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*. 1952;13:199-236.
296. Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci*. 1995;4(9):1666-9.
297. Girish KS, Kempuraju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 2007;80(21):1921-43.

298. Csoka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics*. 1999;60(3):356-61.
299. Csoka AB, Frost GI, Stern R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol*. 2001;20(8):499-508.
300. Stern R, Jedrzejas MJ. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*. 2006;106(3):818-39.
301. Frost GI, Csoka AB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(1):10-5.
302. Csoka AB, Frost GI, Heng HH, Scherer SW, Mohapatra G, Stern R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics*. 1998;48(1):63-70.
303. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol*. 2004;83(7):317-25.
304. Ginetzinsky AG. Role of hyaluronidase in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature*. 1958;182(4644):1218-9.
305. Chao KL, Muthukumar L, Herzberg O. Structure of human hyaluronidase-1, a hyaluronan hydrolyzing enzyme involved in tumor growth and angiogenesis. *Biochemistry*. 2007;46(23):6911-20.
306. Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, et al. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med*. 1996;335(14):1029-33.
307. Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6296-300.
308. Imundo L, Leduc CA, Guha S, Brown M, Perino G, Gushulak L, et al. A complete deficiency of Hyaluronoglucosaminidase 1 (HYAL1) presenting as familial juvenile idiopathic arthritis. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(5):1013-22.
309. Martin DC, Atmuri V, Hemming RJ, Farley J, Mort JS, Byers S, et al. A mouse model of human mucopolysaccharidosis IX exhibits osteoarthritis. *Hum Mol Genet*. 2008;17(13):1904-15.
310. Dumaresq-Doiron K, Edjekouane L, Orimoto AM, Yoffou PH, Gushulak L, Triggs-Raine B, et al. Hyal-1 but not Hyal-3 deficiency has an impact on ovarian folliculogenesis and female fertility by altering the follistatin/activin/smad3 pathway and the apoptotic process. *J Cell Physiol*. 2011.
311. Lepperdinger G, Strobl B, Kreil G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem*. 1998;273(35):22466-70.
312. Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4443-8.
313. Miller AD. Hyaluronidase 2 and its intriguing role as a cell-entry receptor for oncogenic sheep retroviruses. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(4):296-301.

314. Wang F, Grigorieva EV, Li J, Senchenko VN, Pavlova TV, Anedchenko EA, et al. HYAL1 and HYAL2 inhibit tumour growth in vivo but not in vitro. *PLoS One*. 2008;3(8):e3031.
315. Atmuri V, Martin DC, Hemming R, Gutsol A, Byers S, Sahebjam S, et al. Hyaluronidase 3 (HYAL3) knockout mice do not display evidence of hyaluronan accumulation. *Matrix Biol*. 2008;27(8):653-60.
316. Nicoll SB, Barak O, Csoka AB, Bhatnagar RS, Stern R. Hyaluronidases and CD44 undergo differential modulation during chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;292(4):819-25.
317. Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B. Expression and activity of articular cartilage hyaluronidases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251(3):824-9.
318. Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol*. 1990;111(6 Pt 2):2939-49.
319. Myles DG, Primakoff P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol Reprod*. 1997;56(2):320-7.
320. Cherr GN, Yudin AI, Overstreet JW. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol*. 2001;20(8):515-25.
321. Hunnicutt GR, Primakoff P, Myles DG. Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: one activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod*. 1996;55(1):80-6.
322. Oettl M, Hoechstetter J, Asen I, Bernhardt G, Buschauer A. Comparative characterization of bovine testicular hyaluronidase and a hyaluronate lyase from *Streptococcus agalactiae* in pharmaceutical preparations. *Eur J Pharm Sci*. 2003;18(3-4):267-77.
323. Zhang H, Shertok S, Miller K, Taylor L, Martin-Deleon PA. Sperm dysfunction in the Rb(6.16)- and Rb(6.15)-bearing mice revisited: involvement of Hyalp1 and Hyal5. *Mol Reprod Dev*. 2005;72(3):404-10.
324. Yoshida H, Nagaoka A, Kusaka-Kikushima A, Tobiishi M, Kawabata K, Sayo T, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(14):5612-7.
325. Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res*. 2000;60(21):6116-33.
326. Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, et al. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene*. 2004;23(34):5719-28.
327. Tuhkanen H, Anttila M, Kosma VM, Yla-Herttuala S, Heinonen S, Kuronen A, et al. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer*. 2004;109(2):247-52.
328. Nykopp TK, Rilla K, Sironen R, Tammi MI, Tammi RH, Hamalainen K, et al. Expression of hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in serous ovarian carcinomas: inverse correlation between HYAL1 and hyaluronan content. *BMC Cancer*. 2009;9:143.

329. Anttila MA, Tammi RH, Tammi MI, Syrjanen KJ, Saarikoski SV, Kosma VM. High levels of stromal hyaluronan predict poor disease outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2000;60(1):150-5.
330. Hiltunen EL, Anttila M, Kultti A, Ropponen K, Penttinen J, Yliskoski M, et al. Elevated hyaluronan concentration without hyaluronidase activation in malignant epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 2002;62(22):6410-3.
331. Franzmann EJ, Schroeder GL, Goodwin WJ, Weed DT, Fisher P, Lokeshwar VB. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer.* 2003;106(3):438-45.
332. Tan JX, Wang XY, Su XL, Li HY, Shi Y, Wang L, et al. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One.* 2011;6(7):e22836.
333. Delpech B, Laquerriere A, Maingonnat C, Bertrand P, Freger P. Hyaluronidase is more elevated in human brain metastases than in primary brain tumours. *Anticancer Res.* 2002;22(4):2423-7.
334. Kramer MW, Golshani R, Merseburger AS, Knapp J, Garcia A, Hennenlotter J, et al. HYAL-1 hyaluronidase: a potential prognostic indicator for progression to muscle invasion and recurrence in bladder cancer. *Eur Urol.* 2010;57(1):86-93.
335. Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57(4):778-83.
336. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Selzer MG, Hautmann SH, Posey JT, Duncan RC, et al. Bladder tumor markers for monitoring recurrence and screening comparison of hyaluronic acid-hyaluronidase and BTA-Stat tests. *Cancer.* 2002;95(1):61-72.
337. Lokeshwar VB, Obek C, Pham HT, Wei D, Young MJ, Duncan RC, et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J Urol.* 2000;163(1):348-56.
338. Posey JT, Soloway MS, Ekici S, Sofer M, Civantos F, Duncan RC, et al. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res.* 2003;63(10):2638-44.
339. Lokeshwar VB, Cerwinka WH, Lokeshwar BL. HYAL1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Res.* 2005;65(6):2243-50.
340. Lokeshwar VB, Estrella V, Lopez L, Kramer M, Gomez P, Soloway MS, et al. HYAL1-v1, an alternatively spliced variant of HYAL1 hyaluronidase: a negative regulator of bladder cancer. *Cancer Res.* 2006;66(23):11219-27.
341. Tan JX, Ren GS, Tu G, Li XT, Wang XY, Ran L. [Effect of silencing of hyaluronidase gene HYAL1 by RNA interference on proliferation of human breast cancer cells]. Ai Zheng. 2006;25(7):844-8.
342. Tan JX, Wang XY, Li HY, Su XL, Wang L, Ran L, et al. HYAL1 overexpression is correlated with the malignant behavior of human breast cancer. *Int J Cancer.* 2011;128(6):1303-15.
343. Meyer K. Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. *Am J Med.* 1969;47(5):664-72.
344. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life.* 2002;54(4):195-9.
345. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(7):528-39.

346. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med.* 1997;242(1):27-33.
347. Toole BP. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12(2):79-87.
348. Cohen JL, Dayan SH, Brandt FS, Nelson DB, Axford-Gatley RA, Theisen MJ, et al. Systematic review of clinical trials of small- and large-gel-particle hyaluronic acid injectable fillers for aesthetic soft tissue augmentation. *Dermatol Surg.* 2013;39(2):205-31.
349. Gilbert E, Hui A, Waldorf HA. The basic science of dermal fillers: past and present Part I: background and mechanisms of action. *J Drugs Dermatol.* 2012;11(9):1059-68.
350. Gilbert E, Hui A, Meehan S, Waldorf HA. The basic science of dermal fillers: past and present Part II: adverse effects. *J Drugs Dermatol.* 2012;11(9):1069-77.
351. Stern R. Association between cancer and "acid mucopolysaccharides": an old concept comes of age, finally. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(4):238-43.
352. Toole BP, Slomiany MG. Hyaluronan, CD44 and Emmprin: partners in cancer cell chemoresistance. *Drug Resist Updat.* 2008;11(3):110-21.
353. Skubitz AP. Adhesion molecules. *Cancer Treat Res.* 2002;107:305-29.
354. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(4):251-9.
355. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J.* 2011;278(9):1429-43.
356. Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minna JD, Block NL, et al. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001;276(15):11922-32.
357. Lokeshwar VB, Obek C, Soloway MS, Block NL. Tumor-associated hyaluronic acid: a new sensitive and specific urine marker for bladder cancer. *Cancer Res.* 1997;57(4):773-7.
358. Setala LP, Tammi MI, Tammi RH, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Agren UM, et al. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br J Cancer.* 1999;79(7-8):1133-8.
359. Auvinen P, Tammi R, Parkkinen J, Tammi M, Agren U, Johansson R, et al. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am J Pathol.* 2000;156(2):529-36.
360. West DC, Kumar S. Hyaluronan and angiogenesis. *Ciba Found Symp.* 1989;143:187-201; discussion -7, 81-5.
361. West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science.* 1985;228(4705):1324-6.
362. Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, et al. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J Biol Chem.* 2005;280(25):24195-204.
363. Hautmann SH, Lokeshwar VB, Schroeder GL, Civantos F, Duncan RC, Gnann R, et al. Elevated tissue expression of hyaluronic acid and hyaluronidase validates the HA-HAase urine test for bladder cancer. *J Urol.* 2001;165(6 Pt 1):2068-74.
364. Jordan AR, Lokeshwar SD, Lopez LE, Hennig M, Chipollini J, Yates T, et al. Antitumor activity of sulfated hyaluronic acid fragments in pre-clinical models of bladder cancer. *Oncotarget.* 2016.
365. Hershfield MS, Kurtzberg J, Harden E, Moore JO, Whang-Peng J, Haynes BF. Conversion of a stem cell leukemia from a T-lymphoid to a myeloid phenotype induced by the

- adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(1):253-7.
366. Mathieu-Mahul D, Bernheim A, Sigaux F, Daniel MT, Larsen CJ, Berger R. [Translocation t(1; 14) and rearrangement of the gene for the alpha chain of the T-cell receptor in acute T-lymphoblastic leukemia]. C R Acad Sci III. 1986;302(14):525-8.
367. Chen Q, Cheng JT, Tasi LH, Schneider N, Buchanan G, Carroll A, et al. The tal gene undergoes chromosome translocation in T cell leukemia and potentially encodes a helix-loop-helix protein. EMBO J. 1990;9(2):415-24.
368. Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, et al. Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(13):5039-43.
369. Begley CG, Aplan PD, Davey MP, Nakahara K, Tchorz K, Kurtzberg J, et al. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(6):2031-5.
370. Bernard O, Guglielmi P, Jonveaux P, Cherif D, Gisselbrecht S, Mauchauffe M, et al. Two distinct mechanisms for the SCL gene activation in the t(1;14) translocation of T-cell leukemias. Genes Chromosomes Cancer. 1990;1(3):194-208.
371. Aplan PD, Raimondi SC, Kirsch IR. Disruption of the SCL gene by a t(1;3) translocation in a patient with T cell acute lymphoblastic leukemia. J Exp Med. 1992;176(5):1303-10.
372. Kikuchi A, Hayashi Y, Kobayashi S, Hanada R, Moriwaki K, Yamamoto K, et al. Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. Leukemia. 1993;7(7):933-8.
373. Bash RO, Hall S, Timmons CF, Crist WM, Amylon M, Smith RG, et al. Does activation of the TAL1 gene occur in a majority of patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia? A pediatric oncology group study. Blood. 1995;86(2):666-76.
374. Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(24):10128-32.
375. Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Romeo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. Blood. 1993;81(3):647-55.
376. Green AR, Salvaris E, Begley CG. Erythroid expression of the 'helix-loop-helix' gene, SCL. Oncogene. 1991;6(3):475-9.
377. Pulford K, Lecointe N, Leroy-Viard K, Jones M, Mathieu-Mahul D, Mason DY. Expression of TAL-1 proteins in human tissues. Blood. 1995;85(3):675-84.
378. Green AR, Begley CG. SCL and related hemopoietic helix-loop-helix transcription factors. Int J Cell Cloning. 1992;10(5):269-76.
379. Green AR, Lints T, Visvader J, Harvey R, Begley CG. SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. Oncogene. 1992;7(4):653-60.
380. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. Blood. 1994;83(5):1200-8.
381. Hwang LY, Siegelman M, Davis L, Oppenheimer-Marks N, Baer R. Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. Oncogene. 1993;8(11):3043-6.

382. Liao EC, Paw BH, Oates AC, Pratt SJ, Postlethwait JH, Zon LI. SCL/Tal-1 transcription factor acts downstream of cloche to specify hematopoietic and vascular progenitors in zebrafish. *Genes Dev.* 1998;12(5):621-6.
383. Mead PE, Kelley CM, Hahn PS, Piedad O, Zon LI. SCL specifies hematopoietic mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development.* 1998;125(14):2611-20.
384. Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerro A, Coligan J, et al. The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol.* 1990;10(12):6426-35.
385. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 1989;56(5):777-83.
386. Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.* 1991;11(6):3037-42.
387. Wadman IA, Osada H, Grutz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J.* 1997;16(11):3145-57.
388. Lecuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood.* 2002;100(7):2430-40.
389. Hsu HL, Huang L, Tsan JT, Funk W, Wright WE, Hu JS, et al. Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol.* 1994;14(2):1256-65.
390. Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev.* 1994;8(8):970-80.
391. Bernard O, Lecointe N, Jonveaux P, Souyri M, Mauchauffe M, Berger R, et al. Two site-specific deletions and t(1;14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. *Oncogene.* 1991;6(8):1477-88.
392. Cheng JT, Cobb MH, Baer R. Phosphorylation of the TAL1 oncprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol Cell Biol.* 1993;13(2):801-8.
393. Tang T, Prasad KS, Koury MJ, Brandt SJ. Mitogen-activated protein kinase mediates erythropoietin-induced phosphorylation of the TAL1/SCL transcription factor in murine proerythroblasts. *Biochem J.* 1999;343 Pt 3:615-20.
394. Prasad KS, Brandt SJ. Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncprotein. *J Biol Chem.* 1997;272(17):11457-62.
395. Prasad KS, Jordan JE, Koury MJ, Bondurant MC, Brandt SJ. Erythropoietin stimulates transcription of the TAL1/SCL gene and phosphorylation of its protein products. *J Biol Chem.* 1995;270(19):11603-11.
396. Li Y, Deng C, Hu X, Patel B, Fu X, Qiu Y, et al. Dynamic interaction between TAL1 oncprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene.* 2012;31(48):5007-18.
397. Palamarchuk A, Efandov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. Akt phosphorylates Tal1 oncprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Res.* 2005;65(11):4515-9.
398. Cheng JT, Hsu HL, Hwang LY, Baer R. Products of the TAL1 oncogene: basic helix-loop-helix proteins phosphorylated at serine residues. *Oncogene.* 1993;8(3):677-83.

399. Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosl G, Pietsch H, Hoang T, et al. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev.* 2003;17(8):959-64.
400. Xia Y, Brown L, Yang CY, Tsan JT, Siciliano MJ, Espinosa R, 3rd, et al. TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(24):11416-20.
401. Baer R. TAL1, TAL2 and LYL1: a family of basic helix-loop-helix proteins implicated in T cell acute leukaemia. *Semin Cancer Biol.* 1993;4(6):341-7.
402. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.
403. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet.* 2000;1(1):57-64.
404. Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood.* 1996;87(10):4025-39.
405. Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Kontgen F, Harvey RP, et al. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(15):7075-9.
406. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncogene tal-1/SCL. *Nature.* 1995;373(6513):432-4.
407. Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. The T cell leukemia oncogene SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell.* 1996;86(1):47-57.
408. Robb L, Elwood NJ, Elefanti AG, Kontgen F, Li R, Barnett LD, et al. The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *EMBO J.* 1996;15(16):4123-9.
409. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y, et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature.* 2003;421(6922):547-51.
410. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanti AG, Sourris K, Robb L, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(3):992-7.
411. Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev.* 1998;12(4):473-9.
412. Bain G, Engel I, Robanus Maandag EC, te Riele HP, Voland JR, Sharp LL, et al. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol Cell Biol.* 1997;17(8):4782-91.
413. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature.* 1994;372(6502):143-9.
414. Hsu HL, Wadman I, Tsan JT, Baer R. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(13):5947-51.
415. Doyle K, Zhang Y, Baer R, Bina M. Distinguishable patterns of protein-DNA interactions involving complexes of basic helix-loop-helix proteins. *J Biol Chem.* 1994;269(16):12099-105.
416. Tremblay M, Herblot S, Lecuyer E, Hoang T. Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12680-7.

417. Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol.* 2000;1(2):138-44.
418. O'Neil J, Shank J, Cusson N, Murre C, Kelliher M. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell.* 2004;5(6):587-96.
419. Hansson A, Manetopoulos C, Jonsson JI, Axelson H. The basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL inhibits the expression of the p16INK4A and pTalpha genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(4):1073-81.
420. Tan SH, Yam AW, Lawton LN, Wong RW, Young RA, Look AT, et al. TRIB2 reinforces the oncogenic transcriptional program controlled by the TAL1 complex in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2016;30(4):959-62.
421. Bernard M, Delabesse E, Novault S, Hermine O, Macintyre EA. Antiapoptotic effect of ectopic TAL1/SCL expression in a human leukemic T-cell line. *Cancer Res.* 1998;58(12):2680-7.
422. Leroy-Viard K, Vinit MA, Lecointe N, Jouault H, Hibner U, Romeo PH, et al. Loss of TAL-1 protein activity induces premature apoptosis of Jurkat leukemic T cells upon medium depletion. *EMBO J.* 1995;14(10):2341-9.
423. Park ST, Nolan GP, Sun XH. Growth inhibition and apoptosis due to restoration of E2A activity in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J Exp Med.* 1999;189(3):501-8.
424. Agulnick AD, Taira M, Breen JJ, Tanaka T, Dawid IB, Westphal H. Interactions of the LIM-domain-binding factor Ldb1 with LIM homeodomain proteins. *Nature.* 1996;384(6606):270-2.
425. Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, Forster A, Li J, Baer R, et al. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(18):8617-21.
426. Xu Z, Huang S, Chang LS, Agulnick AD, Brandt SJ. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(21):7585-99.
427. Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene.* 2002;21(21):3368-76.
428. Rabbits TH, Axelson H, Forster A, Grutz G, Lavenir I, Larson R, et al. Chromosomal translocations and leukaemia: a role for LMO2 in T cell acute leukaemia, in transcription and in erythropoiesis. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 3:271-2.
429. Foroni L, Boehm T, White L, Forster A, Sherrington P, Liao XB, et al. The rhombotin gene family encode related LIM-domain proteins whose differing expression suggests multiple roles in mouse development. *J Mol Biol.* 1992;226(3):747-61.
430. Boehm T, Foroni L, Kaneko Y, Perutz MF, Rabbits TH. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(10):4367-71.
431. Weiss MJ, Keller G, Orkin SH. Novel insights into erythroid development revealed through in vitro differentiation of GATA-1 embryonic stem cells. *Genes Dev.* 1994;8(10):1184-97.
432. Pevny L, Simon MC, Robertson E, Klein WH, Tsai SF, D'Agati V, et al. Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature.* 1991;349(6306):257-60.

433. Vitelli L, Condorelli G, Lulli V, Hoang T, Luchetti L, Croce CM, et al. A pentamer transcriptional complex including tal-1 and retinoblastoma protein downmodulates c-kit expression in normal erythroblasts. *Mol Cell Biol*. 2000;20(14):5330-42.
434. Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):6939-50.
435. Karacay B, Chang LS. Induction of erythrocyte protein 4.2 gene expression during differentiation of murine erythroleukemia cells. *Genomics*. 1999;59(1):6-17.
436. Hu X, Li X, Valverde K, Fu X, Noguchi C, Qiu Y, et al. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(25):10141-6.
437. Sanda T, Lawton LN, Barrasa MI, Fan ZP, Kohlhammer H, Gutierrez A, et al. Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(2):209-21.
438. Huang S, Brandt SJ. mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol*. 2000;20(6):2248-59.
439. Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, Hamlett I, Guyot B, Iborra FJ, et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(23):10235-50.
440. Huang S, Qiu Y, Stein RW, Brandt SJ. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene*. 1999;18(35):4958-67.
441. Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z, Brandt SJ. P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J*. 2000;19(24):6792-803.
442. Kolodziej S, Kuvardina ON, Oellerich T, Herglotz J, Backert I, Kohrs N, et al. PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation. *Nat Commun*. 2014;5:3995.
443. Hu X, Ybarra R, Qiu Y, Bungert J, Huang S. Transcriptional regulation by TAL1: a link between epigenetic modifications and erythropoiesis. *Epigenetics*. 2009;4(6):357-61.
444. Yoffou PH, Edjekouane L, Meunier L, Tremblay A, Provencher DM, Mes-Masson AM, et al. Subtype specific elevated expression of hyaluronidase-1 (HYAL-1) in epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2011;6(6):e20705.
445. Wang XY, Tan JX, Vasse M, Delpech B, Ren GS. Comparison of hyaluronidase expression, invasiveness and tubule formation promotion in ER (-) and ER (+) breast cancer cell lines in vitro. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(11):1300-4.
446. Lokeshwar VB, Gomez P, Kramer M, Knapp J, McCornack MA, Lopez LE, et al. Epigenetic regulation of HYAL-1 hyaluronidase expression. identification of HYAL-1 promoter. *J Biol Chem*. 2008;283(43):29215-27.
447. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res*. 1998;58(5):877-81.
448. Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Iida N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem*. 2002;277(37):33654-63.
449. Selbi W, de la Motte C, Hascall V, Phillips A. BMP-7 modulates hyaluronan-mediated proximal tubular cell-monocyte interaction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(5):1199-211.

450. Ohno S, Ijuin C, Doi T, Yoneno K, Tanne K. Expression and activity of hyaluronidase in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol.* 2002;73(11):1331-7.
451. Li L, Asteriou T, Bernert B, Heldin CH, Heldin P. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem J.* 2007;404(2):327-36.
452. Bourguignon LY, Gilad E, Rothman K, Peyrollier K. Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression. *J Biol Chem.* 2005;280(12):11961-72.
453. Frasor J, Stossi F, Danes JM, Komm B, Lytle CR, Katzenellenbogen BS. Selective estrogen receptor modulators: discrimination of agonistic versus antagonistic activities by gene expression profiling in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(4):1522-33.
454. Stossi F, Likhite VS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem.* 2006;281(24):16272-8.
455. Karmakar S, Foster EA, Smith CL. Estradiol downregulation of the tumor suppressor gene BTG2 requires estrogen receptor-alpha and the REA corepressor. *Int J Cancer.* 2009;124(8):1841-51.
456. Richeri A, Chalar C, Martinez G, Greif G, Bianchimano P, Brauer MM. Estrogen up-regulation of semaphorin 3F correlates with sympathetic denervation of the rat uterus. *Auton Neurosci.* 2011;164(1-2):43-50.
457. Joseph D, Ho SM, Syed V. Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(2):499-509.
458. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nature Genetics.* 2006;38(11):1289-97.
459. Kwon YS, Garcia-Bassets I, Hutt KR, Cheng CS, Jin M, Liu D, et al. Sensitive ChIP-DSL technology reveals an extensive estrogen receptor alpha-binding program on human gene promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(12):4852-7.
460. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lytle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology.* 2003;144(10):4562-74.
461. Safe S. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.* 2001;62:231-52.
462. Safe S, Kim K. Nuclear receptor-mediated transactivation through interaction with Sp proteins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2004;77:1-36.
463. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene.* 2006;25(51):6868-86.
464. Abdelrahim M, Samudio I, Smith R, 3rd, Burghardt R, Safe S. Small inhibitory RNA duplexes for Sp1 mRNA block basal and estrogen-induced gene expression and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28815-22.
465. Liu XF, Bagchi MK. Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15050-8.

466. Metivier R, Penot G, Carmouche RP, Hubner MR, Reid G, Denger S, et al. Transcriptional complexes engaged by apo-estrogen receptor-alpha isoforms have divergent outcomes. *EMBO J.* 2004;23(18):3653-66.
467. Higgins KJ, Liu S, Abdelrahim M, Vanderlaag K, Liu X, Porter W, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is down-regulated by 17beta-estradiol in MCF-7 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Mol Endocrinol.* 2008;22(2):388-402.
468. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Yearsley K, Gao JX, Barsky SH. ERalpha suppresses slug expression directly by transcriptional repression. *Biochem J.* 2008;416(2):179-87.
469. Hao H, d'Alincourt-Salazar M, Kelley KM, Shatnawi A, Mukherjee S, Shah YM, et al. Estrogen-induced and TAFII30-mediated gene repression by direct recruitment of the estrogen receptor and co-repressors to the core promoter and its reversal by tamoxifen. *Oncogene.* 2007;26(57):7872-84.
470. Suzuki A, Sanda N, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, et al. Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ERalpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J Biol Chem.* 2010;285(18):13444-53.
471. Somech R, Izraeli S, A JS. Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(5):461-72.
472. Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(2):155-64.
473. Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(10):697-708.
474. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 2004;18(19):2315-35.
475. Wu J, Crowe DL. The histone methyltransferase EZH2 promotes mammary stem and luminal progenitor cell expansion, metastasis and inhibits estrogen receptor-positive cellular differentiation in a model of basal breast cancer. *Oncol Rep.* 2015;34(1):455-60.
476. Bhan A, Hussain I, Ansari KI, Bobzean SA, Perrotti LI, Mandal SS. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J Mol Biol.* 2014;426(20):3426-41.
477. Hwang C, Giri VN, Wilkinson JC, Wright CW, Wilkinson AS, Cooney KA, et al. EZH2 regulates the transcription of estrogen-responsive genes through association with REA, an estrogen receptor corepressor. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;107(2):235-42.
478. Shi B, Liang J, Yang X, Wang Y, Zhao Y, Wu H, et al. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27(14):5105-19.
479. Oesterreich S, Deng W, Jiang S, Cui X, Ivanova M, Schiff R, et al. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2003;63(17):5203-8.
480. Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, Kobayashi Y, Goto M, Tai H, et al. 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.* 1999;19(8):5363-72.
481. Treuter E, Albrektsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol.* 1998;12(6):864-81.
482. Hoang T, Lambert JA, Martin R. SCL/TAL1 in Hematopoiesis and Cellular Reprogramming. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:163-204.

483. Schroeder C, Gibson L, Nordstrom C, Beug H. The estrogen receptor cooperates with the TGF alpha receptor (c-erbB) in regulation of chicken erythroid progenitor self-renewal. *EMBO J.* 1993;12(3):951-60.
484. von Lindern M, Boer L, Wessely O, Parker M, Beug H. The transactivation domain AF-2 but not the DNA-binding domain of the estrogen receptor is required to inhibit differentiation of avian erythroid progenitors. *Mol Endocrinol.* 1998;12(2):263-77.
485. Blobel GA, Sieff CA, Orkin SH. Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 1995;15(6):3147-53.
486. Privalsky ML. Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;254:117-36.
487. Zhou Y, Gross W, Hong SH, Privalsky ML. The SMRT corepressor is a target of phosphorylation by protein kinase CK2 (casein kinase II). *Mol Cell Biochem.* 2001;220(1-2):1-13.
488. Varlakhanova N, Hahm JB, Privalsky ML. Regulation of SMRT corepressor dimerization and composition by MAP kinase phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):180-8.
489. Hoberg JE, Yeung F, Mayo MW. SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell.* 2004;16(2):245-55.
490. Stanya KJ, Liu Y, Means AR, Kao HY. Cdk2 and Pin1 negatively regulate the transcriptional corepressor SMRT. *J Cell Biol.* 2008;183(1):49-61.
491. Choi HK, Yoo JY, Jeong MH, Park SY, Shin DM, Jang SW, et al. Protein kinase A phosphorylates NCoR to enhance its nuclear translocation and repressive function in human prostate cancer cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(6):1159-65.
492. Tiefenbach J, Novac N, Ducasse M, Eck M, Melchior F, Heinzel T. SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol Biol Cell.* 2006;17(4):1643-51.
493. Garcia-Bassets I, Kwon YS, Telese F, Prefontaine GG, Hutt KR, Cheng CS, et al. Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell.* 2007;128(3):505-18.
494. Condorelli GL, Tocci A, Botta R, Facchiano F, Testa U, Vitelli L, et al. Ectopic TAL-1/SCL expression in phenotypically normal or leukemic myeloid precursors: proliferative and antiapoptotic effects coupled with a differentiation blockade. *Mol Cell Biol.* 1997;17(5):2954-69.
495. Kusy S, Gerby B, Goardon N, Gault N, Ferri F, Gerard D, et al. NKX3.1 is a direct TAL1 target gene that mediates proliferation of TAL1-expressing human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med.* 2010;207(10):2141-56.
496. Dey S, Curtis DJ, Jane SM, Brandt SJ. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol Cell Biol.* 2010;30(9):2181-92.
497. Peverali FA, Ramqvist T, Saffrich R, Pepperkok R, Barone MV, Philipson L. Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *EMBO J.* 1994;13(18):4291-301.
498. Park ST, Sun XH. The Tal1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J Biol Chem.* 1998;273(12):7030-7.
499. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol.* 1997;17(10):5888-96.

500. Shank-Calvo JA, Draheim K, Bhasin M, Kelliher MA. p16Ink4a or p19Arf loss contributes to Tal1-induced leukemogenesis in mice. *Oncogene*. 2006;25(21):3023-31.
501. Thompson EW, Torri J, Sabol M, Sommers CL, Byers S, Valverius EM, et al. Oncogene-induced basement membrane invasiveness in human mammary epithelial cells. *Clin Exp Metastasis*. 1994;12(3):181-94.
502. Xue C, Plieth D, Venkov C, Xu C, Neilson EG. The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2003;63(12):3386-94.
503. Sommers CL, Walker-Jones D, Heckford SE, Worland P, Valverius E, Clark R, et al. Vimentin rather than keratin expression in some hormone-independent breast cancer cell lines and in oncogene-transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 1989;49(15):4258-63.
504. Sun Y, Wang Y, Fan C, Gao P, Wang X, Wei G, et al. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Mol Cancer*. 2014;13:137.
505. Planas-Silva MD, Waltz PK. Estrogen promotes reversible epithelial-to-mesenchymal-like transition and collective motility in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;104(1-2):11-21.
506. Cardamone MD, Bardella C, Gutierrez A, Di Croce L, Rosenfeld MG, Di Renzo MF, et al. ERalpha as ligand-independent activator of CDH-1 regulates determination and maintenance of epithelial morphology in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7420-5.
507. Elmoneim HM, Zaghloul NM. Expression of E-cadherin, N-cadherin and snail and their correlation with clinicopathological variants: an immunohistochemical study of 132 invasive ductal breast carcinomas in Egypt. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1765-71.
508. Hyun KA, Koo GB, Han H, Sohn J, Choi W, Kim SI, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to loss of EpCAM and different physical properties in circulating tumor cells from metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 2016;7(17):24677-87.
509. Grundker C, Bauerschmitz G, Knapp J, Schmidt E, Olbrich T, Emons G. Inhibition of SDF-1/CXCR4-induced epithelial-mesenchymal transition by kisspeptin-10. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;152(1):41-50.
510. Lazrak M, Deleuze V, Noel D, Haouzi D, Chalhoub E, Dohet C, et al. The bHLH TAL-1/SCL regulates endothelial cell migration and morphogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 7):1161-71.
511. Deleuze V, Chalhoub E, El-Hajj R, Dohet C, Le Clech M, Couraud PO, et al. TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 2007;27(7):2687-97.
512. Lokeshwar VB, Selzer MG. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(4):281-7.
513. Benitez A, Yates TJ, Lopez LE, Cerwinka WH, Bakkar A, Lokeshwar VB. Targeting hyaluronidase for cancer therapy: antitumor activity of sulfated hyaluronic acid in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2011;71(12):4085-95.
514. Sanchez M TA. Growth factor signaling to estrogen receptors in hormone dependent cancers. *Molecular Genetics of Cancer* 2005;5:149-85.
515. Britton DJ, Hutchesson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ERalpha and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat*. 2006;96(2):131-46.

516. Yue W, Fan P, Wang J, Li Y, Santen RJ. Mechanisms of acquired resistance to endocrine therapy in hormone-dependent breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;106(1-5):102-10.
517. Coutts AS, Murphy LC. Elevated mitogen-activated protein kinase activity in estrogen-nonresponsive human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1998;58(18):4071-4.
518. Yan W, Cao QJ, Arenas RB, Bentley B, Shao R. GATA3 inhibits breast cancer metastasis through the reversal of epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*. 2010;285(18):14042-51.
519. Johnsen SA, Gungor C, Prenzel T, Riethdorf S, Riethdorf L, Taniguchi-Ishigaki N, et al. Regulation of estrogen-dependent transcription by the LIM cofactors CLIM and RLIM in breast cancer. *Cancer Res*. 2009;69(1):128-36.