

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Mécanismes d'action des anti-oestrogènes totaux

par

Khalid Hilmi

Département de biochimie

Faculté de Médecine

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

Avril 2008

©Khalid Hilmi, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures



Cette thèse intitulée :

Mécanismes d'action des anti-oestrogènes totaux

présentée par :

Khalid Hilmi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Alain Moreau, président rapporteur

Dr. Sylvie Mader, directeur de recherche

Dr. Mounib Elchebly, membre du jury

Résumé

Les anti-oestrogènes totaux sont actuellement utilisés pour traiter les carcinomes mammaires avancés qui expriment le récepteur des oestrogènes alpha ($ER\alpha$); chez les femmes ménopausées ayant progressées dans la première ligne de thérapie à base de l'anti-oestrogène partiel tamoxifène. Les mécanismes d'action de ces agents demeurent incomplètement caractérisés.

Nous avons montré que ICI 182, 780 (ICI, Fulvestrant, Faslodex) et à un degré moindre l'anti-oestrogène partiel raloxifène (Ral) induisent une résistance de $ER\alpha$ à l'extraction avec un tampon riche en sel (HSB), au niveau des cellules transfectées HepG2 et HEK 293 et au niveau des cellules de carcinomes mammaires MCF7 qui expriment le récepteur de manière endogène.

Les expériences de localisation cellulaire et de FRAP indiquent que le phénomène d'insolubilité prend place au sein d'un compartiment nucléaire, corrèle avec une diminution de la mobilité intranucléaire et avec l'antagonisme exercé par ICI et Ral.

Nous avons identifié et caractérisé trois mutants de l'hélice H12 du domaine de liaison du ligand de $ER\alpha$ (L536A, L539A, L540A) qui augmentent partiellement la solubilité, la transactivation et la mobilité intranucléaire, ces mutants confirment le rôle de l'hélice H12 dans les mécanismes d'action des anti-oestrogènes totaux et relie l'insolubilité de la protéine sauvage à la répression transcriptionnelle.

Nous avons identifié par spectroscopie de masse et validé par immunobuvardage de type Western le complexe de remodelage de la chromatine ATP dépendant de type ISWI; hACF (WCRF180/SNF2h) comme partenaire spécifique de $ER\alpha$ en présence de ICI, le mutant soluble L539A abolit l'interaction avec hACF ce qui indique un rôle du hACF dans le phénomène d'insolubilité. Nos résultats suggèrent un rôle potentiel du remodelage de la chromatine par le complexe hACF dans les mécanismes d'action des anti-oestrogènes totaux.

Mots-clés : récepteur des oestrogènes, anti-oestrogènes totaux, ICI 182, 780, AF-2, FRAP, complexes de remodelage de la chromatine ISWI, hACF.

Abstract

Full antiestrogens are currently used for the treatment of estrogen receptor positive breast cancers in postmenopausal women with disease progression following tamoxifen therapy. The basis for the effects of antiestrogens is not completely understood and remains to be elucidated.

Here we show that ICI 182, 780 (ICI, Fulvestrant, Faslodex) and to a lesser extent the selective estrogen receptor modulator raloxifene (Ral) induces ER α to be resistant to extraction using a high salt buffer (HSB) in HepG2 and HEK293 transfected cells and in the ER positive breast carcinoma cells, MCF7.

Localization and FRAP experiments show that ER α insolubility with ICI and Ral takes place within a nuclear compartment and correlates with the complete repression of ER α transactivation as well as the decrease in nuclear mobility.

We identified and characterized three mutants in the helix 12 of the ligand binding domain of ER α (L536A, L539A, L540A) that increase ER α extraction with HSB, transactivation and mobility. Our data emphasize the contribution of this helix in complete antagonism of full antioestrogens and the link of its insolubility in HSB to nuclear immobilization.

By mass spectrometry, we identified the ISWI ATP dependent remodeling factor hACF as an ER α specific interacting protein in the presence of ICI. The ER α helix 12 soluble mutant L539A in the helix 12 inhibits completely this interaction suggesting a possible role of hACF in ER α insolubility. Our results provide a link between chromatin remodeling by hACF and ER α inactivation by full antioestrogens.

Keywords : Estrogen receptor, Antiestrogens, ICI 182, 780, AF-2, FRAP, ISWI chromatin remodeling factors, hACF

Table des matières

Résumé	p.iii
Abstract	p.v
Table des matières	p.vi
Table des illustrations	p.viii
Liste des sigles et abréviations	p.x
Remerciements	p.xiv
Introduction	p.1
1-Physiologie des oestrogènes	p.1
1-1-Synthèse des oestrogènes.....	p.1
1-2-Effets des oestrogènes sur le système reproducteur.....	p.1
1-3-Effets des oestrogènes au niveau du système nerveux.....	p.2
1-4-Effets des oestrogènes au niveau du système cardiovasculaire.....	p.2
1-5-Effets des oestrogènes sur le tissu osseux.....	p.3
1-6-Implication des oestrogènes dans la tumorigénèse mammaire.....	p.3
2-Les récepteurs des oestrogènes : Structure et fonction	p.6
2-2-La superfamille des récepteurs nucléaires.....	p.6
2-2-Les récepteurs des oestrogènes: structure et fonction.....	p.7
2-3-Activation de la transcription par le récepteur des oestrogènes alpha.....	p.9
2-3-1-Voie génomique classique ERE dépendante.....	p.9
2-3-2-Voie génomique ERE indépendante.....	p.11
2-3-3-Voie non génomique de la signalisation par les oestrogènes.....	p.12
2-4-Mécanismes moléculaires de l'activation du récepteur des oestrogènes.....	p.13
2-4-1-Mode de liaison du ligand.....	p.13
2-4-2-Recrutement des co-régulateurs : les co-activateurs de la famille P160/SRC.....	p.15
2-4-3-Recrutement des co-régulateurs : le complexe médiateur.....	p.16
2-5-Rôle du récepteur des oestrogènes alpha dans la tumorigénèse mammaire	p.17

3-Ciblage du récepteur des oestrogènes alpha dans les cancers hormono-dépendant	p.18
3-1-Développement des anti-oestrogènes partiels de type SERM.....	p.18
3-2-Mécanisme d'action des anti-oestrogènes de type SERM.....	p.21
3-4-Développement des anti-oestrogènes totaux.....	p.25
3-5-Mécanisme d'action des anti-oestrogènes totaux.....	p.26
4-Les complexes du remodelage de la chromatine	p.28
4-1-Organisation de la chromatine chez les eucaryotes.....	p.28
4-2-Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendant.....	p.29
4-2-1-Les complexes de types SWI/SNF.....	p.29
4-2-2-Les complexes de type ISWI.....	p.30
4-2-3-Le complexe ACF1/ISWI.....	p.32
Hypothèse et objectifs	p.35
Matériel et méthodes	p.37
Description et analyse des résultats	p.47
1-Les anti-oestrogènes totaux modifient le profil d'extraction en absence de détergents de ER α dans les cellules HEK293 et HepG2 transfectées de manière transitoire.....	p.47
2-L'insolubilité du récepteur en présence des anti-oestrogènes totaux est observée dans des cellules qui expriment le récepteur de manière endogène....	p.52
3-Rôle de l'hélice H12 dans le phénomène d'insolubilité / répression du récepteur.....	p.54
4-L'insolubilité en présence des anti-oestrogènes totaux corrèle avec une mobilité intra-nucléaire diminuée.....	p.59
5-L'extraction du ER α en présence des anti-oestrogènes est une étape limitante pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction.....	p.63
6-L'identification du complexe hACF comme partenaire spécifique de ER α avec ICI.....	p.68
7-L'anti-oestrogène total RU58668 et raloxifène ne médient pas l'interaction de ER α avec le complexe hACF.....	p.74
Discussion	p.76
Conclusion	p.84
Bibliographie	p.85
Annexes : Contribution des collaborateurs	p.102

Liste des illustrations

Figure 1	
Les régions et domaines de ER α et leurs fonctions.....	p.8
Figure 2	
Repliement du domaine de liaison du ligand (LBD) de ER α en présence de 17 β -estradiol.....	p.14
Figure 3	
Les anti-oestrogènes de type SERM et totaux en comparaison avec 17 β -estradiol.....	p.22
Figure 4	
Effet des anti-oestrogènes sur la conformation de l'hélice H12.....	p.24
Figure 5	
Diversité des complexes de type ISWI.....	p.31
Figure 6	
Domaine des sous-unités du complexe hACF.....	p.33
Figure 7	
Les anti-oestrogènes totaux suppriment l'activité transcriptionnelle de ER α et sa solubilité dans des tampons d'extraction sans détergent dans les cellules HepG2 et HEK293.....	p.50
Figure 8	
Les anti-oestrogènes totaux n'affectent pas la localisation nucléaire prédominante de ER α	p.51
Figure 9	
Les anti-oestrogènes totaux affectent la solubilité du récepteur endogène dans les cellules MCF7.....	p.53
Figure 10	
La région A/B n'est pas nécessaire à l'insolubilité en présence de Ral.....	p.56
Figure 11	
Les contraintes stériques potentielles entre les résidus longs hydrophobes de l'hélice H12 et les chaînes latérales des anti-oestrogènes.....	p.57

Figure 12

Les mutants de l'hélice H12 de ER α modulent l'effet des anti-oestrogènes sur les propriétés de transactivation et d'extraction du récepteur..... p.58

Figure 13

ICI et Ral induisent une immobilisation de ER α mais les mutants de l'hélice H12 augmentent la mobilité intranucléaire en présence d'anti-oestrogènes totaux..... p.61

Figure 14

Les composantes de la matrice nucléaire cytokératines 8 et 18 sont insolubles dans le tampon HSB..... p.62

Figure 15

La fusion HEG0-pC-3xFlag est fonctionnelle et préserve les propriétés de transactivation et d'extraction en présence des anti-oestrogènes..... p.65

Figure 16:

Le tampon à 1% NP40 permet de solubiliser une partie de ER α en présence de ICI..... p.67

Figure 17

Identification par spectroscopie de masse du complexe hACFBAZ1A/ACF1/WCRF180 et (SMARCA5/SNF2h) comme partenaire de ER α en présence de ICI 182,780..... p.71

Figure 18

Le complexe hACF est recruté par ER α en présence de ICI 182,780..... p.72

Figure 19

L'interaction avec ACF en présence de ICI n'est pas due à la signature carboxy-terminale..... p.73

Figure 20

L'interaction hACF et ER α est spécifique à ICI 182,780 et est abolie par le mutant de l'hélice H12 (L539A) p.75

Liste des sigles et des abréviations

A	Alanine
ACF	ATP utilizing chromatin assembly and remodeling factor
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	Activation function 1
AF-2	Activation function 2
AIB1	Amplified in breast cancer 1
AP-1	Activator protein 1
AR	Androgènes récepteur
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adenosine triphosphate
BAF57	Brg-1 associated factor 57
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A
bHLH	Basic Helix-loop-Hélix
BRG1	Brahma related gene 1
BSA	Bovin Serum Albumin
CARM1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CBP	coactivator binding protein
Cdk	Cyclin dependent kinase
CHD1	chromatin-helicase-DNA binding protein 1
CHRAC	chromatin accessibility complexe
CSB	Cockayne Syndrome protein B
CYP19	Cytochrome P450 aromatase 19
DBD	DNA binding domain
DDM1	Decreased DNA methylation 1

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E2	17- β -oestradiol
EGF	Epithelial growth factor
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
eNOS	Nitric oxide synthase
ErbB2	epithelial growth factor 2
ERE	Estrogen response element
FSH	Follicle stimulating hormone
GRIP-1	Glucocorticoid receptor interacting protein 1
HAT	Histone acetyl-transferase
HDAC	Histone deacetylase
HEG0	Récepteur des oestrogènes alpha
HRE	hormone response element
HRP	horseradish peroxidase
HSB	high salt buffer
HSP70	Heat shock protein 70
IB	immunoblotting
ICI	ICI 182,780
IGF	Insulin like growth factor
IL2	interleukine 2
INO80	inositol80
ISWI	imitation switch
LBD	ligand binding domain
LH	luteinizing hormone
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MNAR	modulator of non-genomic action of estrogen receptor

MR	Mineralocorticoid receptor
NCoA	Nuclear receptor coactivator
NcoR	Nuclear receptor corepressor
NFKB	Nuclear Factor kappa bêta
NO	Nitric oxyde
NoRc	Nucleolar remodeling complex
NP40	Nonidet P 40
NURF	Nucleosome remodeling factor
OHT	4-hydroxytamoxifen
P/CAF	p300/CBP associated factor
PAS	Per/ARNT/Sim
PBS	Phosphate buffer salin
PR	progesterone receptor
PRMT1	protein arginine methyltransferase 1
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
Q	Glutamine
R	Arginine
Ral	Raloxifen
RAR	Retinoid acid receptor
RSF	remodeling and spacing factor
RXR	Retinoid X receptor
S	Sérine
SATB1	Special AT rich binding protein1
SDS	sodium dodecyl sulfat
SDS PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SERM	Selective estrogen receptor modulator
SLIDE	SANT like domaine
SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1
SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
SRC-2	Steroid receptor coactivator 2
SRC-3	Steroid receptor coactivator 3
STAT5	Signal transducers and activator of transcriptions 5
SWI/SNF	switch/sucrose non fermenting
TFIIA	Transcription factor IIA
TFIIB	Transcription factor IIB
TFIID	Transcription factor IID
TFIIE	Transcription factor IIE
TFIIH	Transcription factor IIH
TIF-2	Transcription intermediary factor 2
TR	Thyroid hormone receptor
TRAP220	Thyroid hormone receptor-associated protein complex component
TRIP1	thyroid receptor interacting protein 1
VDR	Vitamin D3 Receptor
WCRF	Willams syndrome transcription factor related chromatine-remodeling factor
WSTF	Willams syndrome transcription factor
WT	wild-type
X	Acide aminé quelconque
Y	Tyrosine

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice Dr. Sylvie Mader qui m'a accueilli dans son laboratoire. À travers ses nombreux conseils, Sylvie tenait à m'inculquer une démarche scientifique adéquate.

Merci à mes parents pour leurs sacrifices et leur amour. Mes sœurs qui m'ont offert l'opportunité de poursuivre des études à l'étranger. Merci également à Christine pour son soutien inconditionnel, et sa compréhension.

Merci à mes amis, à mes collègues pour leurs conseils et pour l'ambiance amicale du laboratoire

Introduction

1-Physiologie des oestrogènes

1-1-Synthèse des oestrogènes

Chez la femme avant la ménopause, les oestrogènes sont biosynthétisés principalement au niveau des ovaires par les cellules de la granulosa, à partir du cholestérol sous l'effet des hormones FSH et LH (Buzdar and Robertson 2006). L'aromatase microsomale CYP19 se lie au carbone 19 d'un précurseur androgénique et catalyse la formation du noyau phénolique caractéristique des oestrogènes (Simpson and Davis 2001) (Riggs, Khosla et al. 2002). On distingue trois formes d'oestrogènes: estrone (E1), estriol (E3) et 17 β -estradiol (E2) qui est la forme circulante principalement. Chez la femme après la ménopause et chez l'homme, la synthèse des oestrogènes s'effectue à l'extérieur des gonades, au niveau du tissu adipeux, des os, du cerveau, et dans les cellules du muscle squelettique. Les oestrogènes agissent alors de manière paracrine ou intracrine (Simpson, Rubin et al. 2000).

1-2-Effets des oestrogènes sur le système reproducteur

Les oestrogènes sont au cœur de toutes les fonctions du système reproducteur chez le sexe féminin. Ils permettent le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires lors de la puberté en stimulent la maturation des ovaires (Lubahn, Moyer et al. 1993). Lors de chaque cycle menstruel, les oestrogènes participent à la maturation de la muqueuse utérine et à la mise en place de la nidation en cas de fécondation. Ils permettent également de maintenir la grossesse et activent la lactogenèse.

1-3-Effets des oestrogènes au niveau du système nerveux

Des neuroscientifiques ont observé que les oestrogènes modifient la conductance des ions au sein des cellules neuronales (Maggi, Ciana et al. 2004). Les oestrogènes exercent un effet neuroprotecteur sur des modèles de neurones. Des doses picomolaires de E2 soutiennent la survie cellulaire dans des conditions de privation de sérum (McEwen and Alves 1999). Les oestrogènes améliorent les performances qui impliquent la mémoire verbale et les fonctions cognitives dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Fillit, Weinreb et al. 1986) (Sherwin 1997) (Green and Simpkins 2000). La modulation des fonctions des neurotransmetteurs et l'augmentation de la synaptogenèse sont les mécanismes les plus retenus pour expliquer l'effet neuroprotecteur des estrogènes (Green and Simpkins 2000).

1-4-Effets des oestrogènes au niveau du système cardiovasculaire

L'effet protecteur des oestrogènes au niveau du système cardiovasculaire repose sur le fait que l'incidence des maladies cardiovasculaires est plus faible chez les femmes avant la ménopause comparativement aux hommes. Cependant, une étude clinique récente suivant l'effet de la thérapie de substitution hormonale sur le système cardiovasculaire chez les femmes après la ménopause (HERS) n'a pas montré un effet concluant des oestrogènes sur la mortalité ou la morbidité cardiovasculaire (Klouche 2006). Les oestrogènes jouent un rôle anti-athérosclerotique en réduisant la densité des lipoprotéines (LDL) et en favorisant la fibrinolyse. Ils ralentissent la progression des lésions et permettent la relaxation et la vasodilatation des petites et des grandes artères (Caulin-Glaser, Garcia-Cardena et al. 1997) (Lantin-Hermoso, Rosenfeld et al. 1997) (Klouche 2006).

1-5-Effets des oestrogènes sur le tissu osseux

Les oestrogènes jouent un rôle important dans la maturation du squelette. À la puberté, la sécrétion des gonadotrophines augmente la synthèse des oestrogènes qui induisent une croissance rapide des os pendant une période de 3 à 4 ans (Parfitt, Travers et al. 2000). Un deuxième rôle consiste à la préservation de la densité osseuse. En fait, la déficience en oestrogènes chez la femme en ménopause est bien reliée à l'ostéoporose et l'administration des oestrogènes améliore le bilan calcique (Khosla, Melton et al. 1998). Les oestrogènes contrôlent la balance entre la formation et la résorption des os. Ils constituent un signal pro-apoptotique au niveau des ostéoclastes et stimulent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes. (Riggs, Khosla et al. 2002).

1-6- Implication des oestrogènes dans la tumorigénèse mammaire

En 1896, Beaston et Boyd établirent le lien entre les hormones ovariennes et le cancer du sein par le fait que l'ablation des ovaires permet la régression des tumeurs chez les femmes pré ménopausées. Plus tard en 2002, les oestrogènes ont été classés comme carcinogènes par le US National Toxicology Programme and Cancer (Shang 2007). L'exposition aux oestrogènes est un facteur déterminant dans l'initiation, la promotion et la progression du cancer du sein. Une puberté précoce et une ménopause tardive augmentent la durée d'exposition aux oestrogènes. Les jeunes filles qui débutent la puberté une année plus tard par rapport à la moyenne ont jusqu'à 20% de réduction du risque de développer le cancer du sein. D'autre part, une ménopause avant l'âge de 45 ans réduit de 50% le risque de la maladie par rapport à une ménopause tardive après 55 ans (Bernstein and Ross 1993; Feigelson and Henderson 1996).

Il existe une corrélation positive entre l'augmentation des niveaux des oestrogènes circulants et le risque de développer le cancer du sein. Des études épidémiologiques prospectives ont permis de détecter des niveaux élevés des oestrogènes au niveau du plasma des femmes qui ont pu développer des tumeurs mammaires 5 ans plus tard (Toniolo, Levitz et al. 1995; Dorgan, Longcope et al. 1997) (Foidart, Desreux et al. 2007)

alors que des niveaux faibles des oestrogènes plasmatiques sont habituellement détectés au niveau des populations à faible risque (Bernstein, Ross et al. 1990).

L'incidence du cancer du sein demeure élevée chez des femmes ménopausées après le déclin de la production des oestrogènes par les ovaires. L'incidence est d'autant plus forte quand il s'agit de groupe de femmes avec un excès de poids (Foidart, Desreux et al. 2007). En fait, une synthèse locale des oestrogènes continue à s'effectuer au niveau de plusieurs autres tissus dont le tissu adipeux périphérique et au niveau de la glande mammaire par les cellules épithéliales. Cette production *in situ* est due à une forte expression de l'enzyme aromatasase qui synthétise les oestrogènes à partir de leurs précurseurs androgéniques (Miller and O'Neill 1987). L'expression de cette enzyme au niveau des tumeurs mammaires est significativement plus grande que dans les lésions bénignes et permet d'atteindre des niveaux locaux très élevés en oestrogènes (O'Neill and Miller 1987; Santen, Santner et al. 1997). Il a été suggéré que le microenvironnement formé par les tumeurs et leur stroma stimule l'expression de l'aromatase par les fibroblastes du stroma via la production de plusieurs facteurs comme la prostaglandine E2, TNF α , IL 6 et IL11 (Simpson and Davis 2001). Ces facteurs activent également le recrutement des cellules du système immunitaire et influencent l'expansion et la progression des tumeurs mammaires (Gupta and Kuperwasser 2006)

Au niveau cellulaire, plusieurs mécanismes non exclusifs peuvent expliquer l'effet carcinogénique des oestrogènes. Ces molécules induisent la prolifération des cellules épithéliales mammaires à travers des récepteurs nucléaires appelés récepteurs aux oestrogènes, ces récepteurs agissent comme des facteurs de transcription hormono-dépendant et régulent l'expression de gènes cibles jouant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. D'autre part, une surexpression de ces récepteurs est caractéristique des deux tiers de tumeurs mammaires (Holst, Stahl et al. 2007). La prolifération rapide est en corrélation avec une accélération du cycle cellulaire, elle réduit le temps nécessaire pour les mécanismes de réparation de l'ADN et augmente les niveaux de l'ADN endommagé et les risques de mutations (Jefcoate, Liehr et al. 2000).

Il existe d'autres mécanismes qui n'impliquent pas nécessairement les récepteurs des oestrogènes traditionnels. Des observations effectuées sur des modèles animaux ont montré que l'administration des oestrogènes à des souris qui n'expriment pas le récepteur des oestrogènes et qui expriment l'oncogène Wnt peuvent développer des tumeurs mammaires (Bocchinfuso and Korach 1997). Ces observations ont été appuyées par le fait que 17β estradiol ou son métabolite 4-hydroxycatechols induisent la formation des adénocarcinomes mammaires dans les modèles animaux et cellulaires (Russo and Russo 1996) (Russo and Russo 2006). Le métabolisme des oestrogènes génère des 3,4 estrogènes quinones. Ces métabolites électrophiles forment des adduits avec les adénines et guanines menant à une dépurination de l'ADN et peuvent également causer des dommages oxydatifs aux protéines (Bolton and Thatcher 2008) (Yager and Davidson 2006). La réaction d'hydroxylation du 17β -estradiol est la première étape d'activation métabolique des oestrogènes, elle est effectuée par les 4-hydroxylases P4501B1 et P4501A1 qui sont fortement exprimés au niveau des tumeurs mammaires. Des études épidémiologiques relient l'augmentation du risque du cancer du sein avec un polymorphisme des 4-hydroxylases (Singh, Chakravarti et al. 2005).

2-Les récepteurs des oestrogènes: structure et fonction

2-1-La superfamille des récepteurs nucléaires

En 1962, Jensen et Jacobsen ont observé la présence de sites de liaison du 17β -estradiol au niveau de l'utérus et ont conclu que l'action des oestrogènes passe par une protéine réceptrice. En 1986, deux groupes rapportent le clonage de l'ADN complémentaire du récepteur des oestrogènes alpha ($ER\alpha$) à partir de cellules MCF7 (Greene, Gilna et al. 1986) (Green, Walter et al. 1986). Ce récepteur est devenu avec celui des glucocorticoïdes un prototype de la superfamille des récepteurs nucléaires. Plus tard en, 1996, l'ADN du récepteur des oestrogènes bêta ($ER\beta$) a été cloné à partir de la prostate du rat (Kuiper, Enmark et al. 1996). La super famille des récepteurs nucléaires compte 48 membres qui jouent de nombreux rôles dans le développement, le métabolisme, la différenciation et la reproduction. Les récepteurs nucléaires se caractérisent par la présence d'un domaine central appelé domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui permet de lier des séquences spécifiques au niveau de l'ADN appelées éléments de réponses aux hormones (HRE) et une région carboxy-terminale qui possède l'essentiel de la propriété de reconnaissance et de liaison des ligands (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995).

La superfamille des récepteurs nucléaires peut être divisée en 4 familles selon les propriétés de dimérisation et de liaison à l'ADN (Stunnenberg 1993). La classe I inclut les récepteurs des hormones stéroïdiennes: les récepteurs des oestrogènes (ER), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur des androgènes (AR), le récepteur de la progestérone (PR) et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR). Ces récepteurs une fois activés par les ligands, se dissocient des complexes inactivant formés de protéines chaperonnes et se lient à leur HRE respectifs sous forme d'homodimères, Les HREs de cette classe sont organisés en palindromes ($\rightarrow\leftarrow$) de manière à ce que chaque monomère de récepteur se fixe sur un demi site.

La classe II des récepteurs nucléaires lie des éléments de réponse en répétition directe ($\rightarrow\rightarrow$) ou en palindromes inversés ($\leftarrow\rightarrow$) sous forme d'hétéro dimères obligatoires avec RXR et ce en absence du ligand. Cette classe inclut le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR), le récepteur de l'acide rétinoïque *tout-trans* (RAR), le récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis (RXR) et le récepteur de la vitamine D3 (VDR). Les classes III et IV contiennent des

récepteurs qui peuvent lier l'ADN sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère avec RXR (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995).

2-2-Les récepteurs des oestrogènes: structure et fonction

Les ERs sont codés par deux gènes différents, le gène ER α étant localisé au niveau du chromosome 6, alors que celui de ER β se trouve au niveau du chromosome 14 (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997). Les patrons d'expression des deux récepteurs varient dans le temps et selon les tissus ce qui indique des fonctions biologiques différentes (Kuijper, Enmark et al. 1996) (Barkhem, Carlsson et al. 1998). Les deux récepteurs présentent six régions d'identité de séquence, caractérisés d'après leurs degrés de conservation au sein de la superfamille des récepteurs nucléaires. Les six régions sont nommées de A à F à partir de l'extrémité amino-terminale (**Fig 1**). La région A/B a une identité de séquence de 30% dans les deux récepteurs. Elle contient une fonction d'activation hormono-indépendant (AF-1) dont l'activité est variable selon le contexte du promoteur et selon le type cellulaire (Berry, Metzger et al. 1990) (Metzger, Losson et al. 1992). La région C présente 90% d'identité dans les deux ER et sert de critère de classification des récepteurs nucléaire. Il constitue avec une portion de la région D, le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Le DBD, contient deux doigts de zinc de type C4 et un signal de localisation nucléaire. Le récepteur est capable de lier avec une forte affinité une séquence consensus de 15 pb appelée: élément de réponse aux oestrogènes (ERE 5'-PuGGTCAnnnTGACCPy-3') (Klein-Hitpass, Kaling et al. 1988). D'autres séquences qui ressemblent au consensus peuvent être liées avec des affinités variables. Les EREs peuvent se situer à de longues distances du site d'initiation de la transcription (Bourdeau, Deschenes et al. 2004). La région D est une région charnière avec une portion qui interagit avec les HSP90. Finalement, les régions E et F sont identiques à 53% à ceux du ER β , elles constituent le domaine du liaison du ligand (LBD) qui contient une fonction d'activation ligand dépendant (AF-2), des interfaces de dimérisation et d'interaction avec les HSP90 (Nilsson, Makela et al. 2001; Hart and Davie 2002).

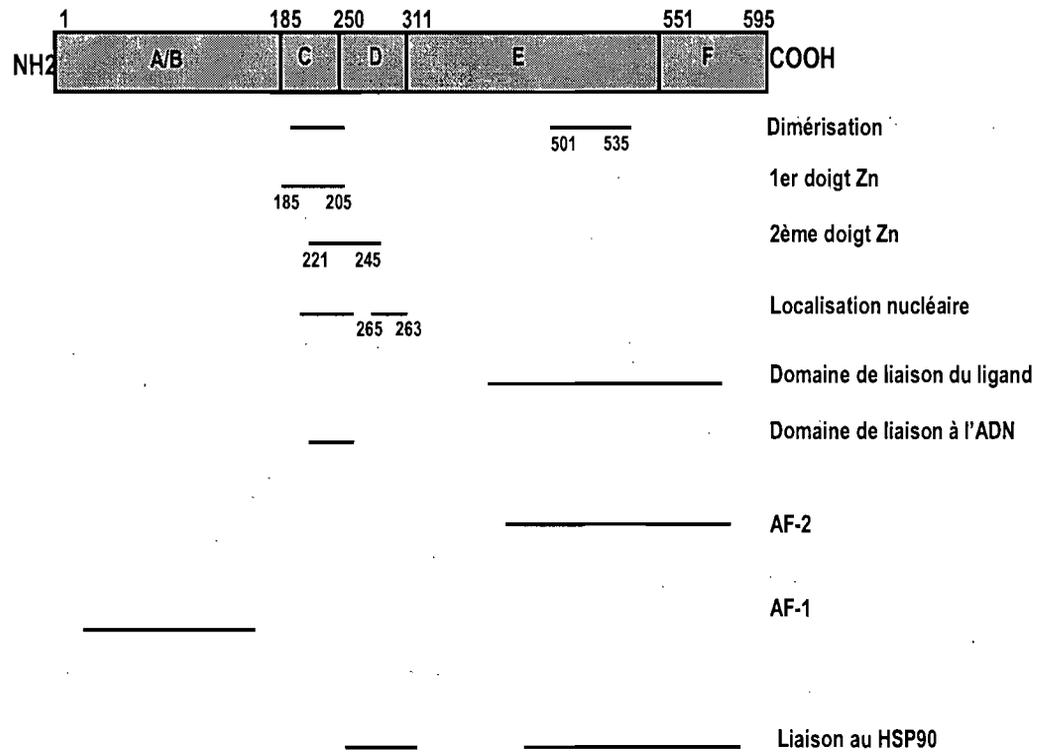


Fig.1. Les régions et domaines de ER α et leurs fonctions. ER α présente six régions modulaires qui lui permettent de se localiser dans le noyau, de se dimériser, lier le ligand, fixer l'ADN et réguler la transcription via les deux fonctions d'activation AF-1 et AF-2 (adapté de Hart and Davie 2002).

2-3-Activation de la transcription par le récepteur des oestrogènes alpha

2-3-1-Voie génomique classique ERE dépendente

Contrairement aux hormones et aux facteurs de croissance hydrophiles qui lient des récepteurs situés au niveau de la surface cellulaire, les oestrogènes de par leur nature lipophile diffusent passivement à travers la bicouche lipidique et se rendent au noyau, par des mécanismes encore mal caractérisés, où ils activent leurs récepteurs. Le récepteur des oestrogènes alpha est un facteur de transcription hormono-dépendant. En absence du ligand, ER α est majoritairement nucléaire, une petite fraction étant membranaire (Pappas, Gametchu et al. 1995). Il se trouve associé à l'état monomérique à un complexe inactivant formé des protéines chaperonnes (HSP70 et 90), la co-chaperonne p23 et des immunophilines mais peut se trouver aussi sous forme de dimère libre (Pratt and Toft 1997) (Weigel and Zhang 1998). Globalement, 17 β -estradiol se lie à ER α avec une affinité de moyenne de 0,3 nM (Anstead, Carlson et al. 1997; Toran-Allerand, Tinnikov et al. 2005) et entraîne un changement conformationnel qui permet au récepteur de se dissocier de son complexe inactivant, de se dimériser ou hétérodimériser avec ER β et de fixer les ERE situés dans les promoteurs des gènes cibles des oestrogènes (Pace, Taylor et al. 1997).

Les dimères du récepteur, fixés sur les EREs amorcent un recrutement séquentiel de co-régulateurs (Wood, Greene et al. 1998). Le complexe SWI/SNF humain BRG1/BRM est le premier cofacteur recruté par sa sous unité BAF57 (Fryer and Archer 1998), ensuite le complexe formé de co-activateurs de la famille p160/SRC-1 et des co-intégrateurs CBP/P300 et p/CAF qui possédant une activité histone acétyltransférase intrinsèque (Kamei, Xu et al. 1996). CARM1 et PRMT sont aussi recrutés par les co-activateurs de la famille p160, ces cofacteurs possèdent une activité de type histone méthyltransférase. Ensemble, ces complexes déstabilisent les nucléosomes par des mécanismes ATP dépendant dans le cas de SWI/SNF ou par des modifications des queues des histones sur des résidus lysines ou arginines spécifiques. Le résultat est l'affaiblissement des interactions entre l'ADN et les histones et l'ouverture des nucléosomes.

Par ailleurs, au niveau du site d'initiation de la transcription, il y a assemblage du complexe de pré initiation qui compte la polymérase II et les facteurs de transcription généraux (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH). Finalement, le complexe médiateur

TRAP/DRIP qui est aussi un cofacteur de ER α est recruté faisant le lien entre le complexe co-activateur et la machinerie basale de transcription (Fondell, Ge et al. 1996).

Il existe des mécanismes d'activation du récepteur qui ne nécessitent pas la liaison du ligand. En effet ER α peut être activé par les voies de signalisation impliquant les facteurs de croissance. La voie des MAPK kinase est en grande partie responsable de la phosphorylation des sérines de la région A/B du récepteur. Il a été démontré que les sérines 118 et 167 sont des résidus cibles des MAPK suite à l'activation par EGF et IGF (Joel, Traish et al. 1995; Kato, Endoh et al. 1995). La sérine 167 de ER α peut aussi être la cible de la kinase AKT, un effecteur de la voie des PI3 kinase impliqué dans la survie cellulaire (Kato 2001) (Campbell, Bhat-Nakshatri et al. 2001). De leur côté, les sérines 104 et 106 sont plutôt la cible du complexe cyclin A/cdk2 et ce de façon hormono-indépendant (Rogatsky, Trowbridge et al. 1999.) Les phosphorylations de la région A/B favorisent le recrutement de co-activateurs transcriptionnels capables de remodeler la chromatine et d'augmenter l'efficacité de l'initiation de la transcription des gènes ciblés (Rochette-Egly 2003)

2-3-2-Voie génomique ERE indépendante

La présence des ERE dans un promoteur donné n'est pas une condition *sine qua non* de la régulation du gène par les oestrogènes puisque de nombreux gènes cibles des oestrogènes ne contiennent pas d'ERE de haute affinité. En fait, d'autres séquences d'ADN peuvent médier les effets des œstrogènes sans qu'elles soient liées directement par les récepteurs des oestrogènes. Au niveau de ces séquences les récepteurs sont recrutés par des facteurs de transcription déjà fixés sur leurs propres éléments de réponse et peuvent activer ou réprimer les gènes cibles des oestrogènes. L'exemple le mieux connu est celui des éléments de type AP-1 qui sont liés par le complexe Fos-Jun au niveau des promoteurs de l'ovalbumine, IGF-8, la collagénase et la Cyclin D1 (Gaub, Bellard et al. 1990; Umayahara, Kawamori et al. 1994; Webb, Lopez et al. 1995). ER α interagit avec le complexe AP-1 à l'aide de la fonction AF-2 et le DBD semble ainsi jouer un rôle dans ces interactions et le recrutement des p160 stabilise le complexe multi-protéique (Webb, Nguyen et al. 1999; Kushner, Agard et al. 2000).

D'autres gènes peuvent être régulés également de manière ERE indépendante, les promoteurs riches en séquence GC où le récepteur est recruté par le facteur SP-1 (Porter, Saville et al. 1997), ER α est recruté par le facteur NF κ B et C/EBP β pour maintenir la répression au niveau du gène IL-6 où (Ray, Prefontaine et al. 1994; Stein and Yang 1995). Les facteurs de transcription GATA1 et STAT5 sont aussi impliqués dans des mécanismes similaires (Blobel, Sieff et al. 1995) (Stoecklin, Wissler et al. 1999).

2-3-3-Voie non-génomique de la signalisation par les oestrogènes

De nombreuses observations montrent que les oestrogènes exercent des effets très rapides ne pouvant être expliqués par l'activation de la transcription et la synthèse de protéines. Ces effets non-transcriptionnels incluent: la mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation des adénylates cyclases et l'activation des voies de signalisation des MAPK kinases (Improta-Brears, Whorton et al. 1999) (Aronica, Kraus et al. 1994; Migliaccio, Di Domenico et al. 1996). Les effets non-transcriptionnels des oestrogènes ont été attribués à une sous-population de récepteur des oestrogènes localisée au niveau de la membrane plasmique (Pietras and Szego 1977) (Parikh, Anderson et al. 1980) (Monje and Boland 1999). Cette localisation membranaire a été attribuée à une palmitoylation de ces récepteurs (Li, Haynes et al. 2003) (Acconcia, Ascenzi et al. 2004). Le mécanisme prototype des effets non-transcriptionnels des oestrogènes provient du système cardiovasculaire où les oestrogènes induisent la vasodilatation en l'espace de quelques secondes (Gilligan, Quyyumi et al. 1994) et ce, en induisant la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) au niveau des cellules endothéliales par l'acide nitrique synthétase (eNOS) (Caulin-Glaser, Garcia-Cardena et al. 1997) (Lantin-Hermoso, Rosenfeld et al. 1997).

Au niveau des cellules du cancer du sein MCF7, des récepteurs des oestrogènes traditionnels ont été détectés au niveau de la membrane plasmique où ils mettent en place des complexes incluant des protéines d'échafaudage caveoline-1, MNAR, les sous unités activatrices de la protéine G et de la PI3kinase (Migliaccio, Pagano et al. 1993) (Migliaccio, Di Domenico et al. 1996) (Monje, Zanello et al. 2001) (Castoria, Migliaccio et al. 2001). Ces complexes activent les voies MAPK et AKT qui sont impliqués dans la prolifération et dans la survie cellulaire au niveau des cellules MCF7. Les récepteurs des oestrogènes membranaires interagissent directement avec ErbB2 et avec les récepteurs des facteurs de croissance IGF-1 et EGF et activent ces récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. (Kahlert, Nuedling et al. 2000; Chung, Sheu et al. 2002). Au niveau des cellules du foie HepG2 un mécanisme semblable qui implique l'induction de la cycline D1 a été observé (Marino, Acconcia et al. 2002).

2-4-Mécanismes moléculaires de l'activation du récepteur des oestrogènes

2-4-1-Mode de liaison du ligand

La structure cristallographique du récepteur des oestrogènes alpha avec le 17 β -estradiol montre que le domaine de liaison du ligand (LBD) est formé de trois couches de alpha hélices. Au centre se trouvent trois hélices H5/H6, H9 et H10. Des deux côtés se trouvent les hélices H1 à H4 et les hélices H7, H8 et H11 (**Fig 2**). Le restant du LBD est composé de deux feuillets anti-parallèle S1 et S2 et finalement une hélice H12 essentielle pour l'activation du récepteur (Brzozowski, Pike et al. 1997). Cet arrangement aménage une cavité hydrophobe ellipsoïdale qui peut accueillir une variété de ligands hydrophobes ayant un anneau phénolique (Anstead, Carlson et al. 1997).

Le 17 β -estradiol se lie en diagonale au niveau de la cavité du LBD et établit des liens par ponts hydrogènes avec le groupe carboxylate de la glutamine 353, le guanidinium de l'arginine 394 et une molécule de H₂O, le reste de la molécule participe à des interactions hydrophobes. L'hélice H12 est très mobile en absence du ligand et la présence de E2 stabilise sa conformation. Elle se replie sur le LBD et s'accote sur les hélices H3, H5/H6 et H11. Ce repliement lui permet de projeter son côté hydrophobe vers le ligand sans établir des contacts avec lui et d'exposer son côté chargé qui comprend les résidus aspartates 538 et 545 et la glutamate 542 vers le solvant. Cette conformation de l'hélice H12 est définie comme la conformation agoniste de la fonction d'activation AF-2. H12 constitue avec les hélices H3, H4 et H5 une surface en sillon nécessaire pour la reconnaissance et l'interaction avec les protéines co-régulatrices (Pike, Brzozowski et al. 2000; Savkur and Burris 2004).

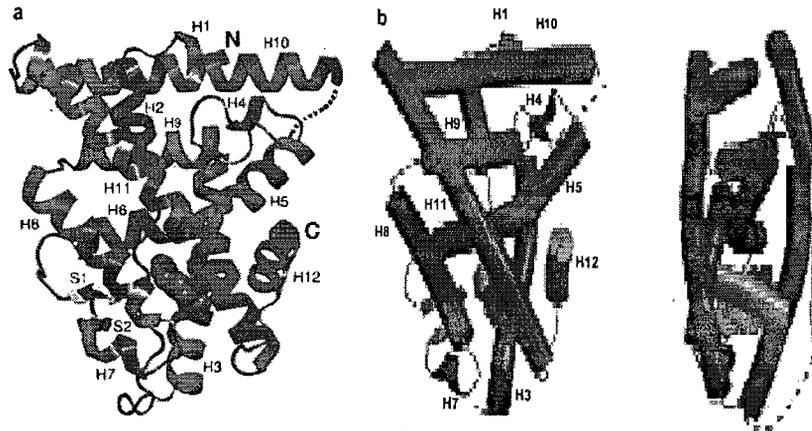


Fig. 2. Repliement du domaine de liaison du ligand (LBD) de ER α en présence de 17 β -estradiol. (a) représentation en rubans et (b) en cylindre de la conformation des hélices alpha et feuillet bêta. Conformation agoniste de AF-2: L'hélice H12 couvre la cavité du LBD et occupe un espace entre les hélices H3/H4 et H5 (adapté de Brzozowski, Pike et al. 1997).

2-4-2-recrutement des co-régulateurs: les co-activateurs de la famille P160/SRC

Des protéines interagissant avec le récepteur des oestrogènes de manière ligand dépendante furent identifiées la première fois lors d'expériences de *GST pull down* et ont été nommées ensuite P160 à cause de leur poids moléculaire (Halachmi, Marden et al. 1994). Cette famille contient trois membres: SRC1 (p160-NCoA-1) est le premier co-activateur des récepteurs nucléaires à avoir été cloné; SRC-2 (TIF-2, GRIP1, NCoA2) et SRC-3 (ACTR, AIB1, RAC3, TRAM1) qui est amplifié dans le cancer du sein (Nilsson, Makela et al. 2001). Au niveau transcriptionnel, la famille des p160/SRC exerce un effet stimulateur sur l'activité de ER α et ER β et cette activité peut être inhibée par des inhibiteurs compétitifs des récepteurs (Onate, Tsai et al. 1995). Le recrutement des co-activateurs nécessite la fonction AF-2 du LBD. Cependant, la fonction AF-1 a ses propres co-activateurs comme p69 RNA hélicase et peut avoir une synergie avec la fonction AF-2 pour le recrutement des co-activateurs (Metivier, Penot et al. 2001).

Les co-activateurs de la famille des p160/SRC contiennent trois domaines caractéristiques: un domaine amino-terminal bHLH, un domaine PAS impliqués dans les interactions protéiques et un domaine carboxy-terminal munit d'une activité enzymatique histone acétyltransférase et qui permet l'interaction avec CBP/p300. Le domaine central contient une signature moléculaire qui consiste en trois motifs conservés LXXLL (L: leucine et X: n'importe quel acide aminé) et permet l'interaction avec la fonction AF-2 des récepteurs nucléaires dans sa conformation agoniste (Heery, Kalkhoven et al. 1997). L'affinité et la sélectivité de liaison des motifs LXXLL varient au sein d'un même co-activateur et d'un membre à l'autre au sein de la famille p160/SRC et les régions qui flanquent les motifs LXXLL semblent moduler ces deux processus (McInerney, Rose et al. 1998; Voegel, Heine et al. 1998).

La structure cristallographique du deuxième motif de type LXXLL du co-activateur GRIP-1 en interaction avec le LBD du ER α ayant une AF-2 en conformation agoniste montre que, le motif LXXLL adopte une conformation en hélice. La glutamine 542 conservée au niveau de l'hélice H12 fait un pont hydrogène avec l'amide de l'acide aminé qui se trouve en amino-terminal du peptide LXXLL alors que la lysine K362 conservée au niveau de l'hélice H3 fait un pont hydrogène avec la fonction carboxy-terminale du peptide LXXLL.

Ce positionnement permet de bien diriger le côté hydrophobe du peptide vers la cavité du LBD et la mise en place d'interactions hydrophobes (Savkur and Burris 2004).

2-4-3-recrutement des co-régulateurs: le complexe médiateur

Le complexe médiateur TRAP/SMCC/DRIP/ARC permet le recrutement du complexe de la machinerie basale de la transcription par divers facteurs de transcription (Ito, Yuan et al. 1999) (Freedman 1999). La sous unité TRAP220 interagit avec ER α et TR de manière ligand dépendant. Cette interaction est attribuée à des motifs de type LXXLL situés au niveau de la région amino-terminale de TRAP220 (Yuan, Ito et al. 1998). ER α est moins efficace que ER β en terme du recrutement du complexe TRAP/DRIP *in vitro*, ce qui peut justifier les différences physiologiques entre les deux récepteurs (Warnmark, Almlöf et al. 2001) (Warnmark, Wikström et al. 2001). Il a été suggéré que l'acétylation de la fonction AF-2 des récepteurs nucléaires induit la dissociation de co-activateurs de la famille p160 /SRC-1. Ceci permet le recrutement cyclique d'autres complexes co-activateurs TRAP/DRIP (Chen, Lin et al. 1999).

2-5-Rôle du récepteur des oestrogènes alpha dans la tumorigenèse mammaire

Les observations cliniques et épidémiologiques montrent que les oestrogènes sont nécessaires pour le développement normal des glandes mammaires et jouent un rôle la formation des tumeurs. L'expression du récepteur est plus élevée dans le tissu mammaire des femmes issues de populations à haut risque par rapport à des femmes issues de populations à faible risque.

L'ablation du gène du récepteur chez la souris rend le développement de la glande mammaire impossible même après la stimulation avec les oestrogènes. Cette ablation permet aussi d'avoir une résistance à la transformation maligne et ce même après la transduction avec un oncogène (Bocchinfuso and Korach 1997). Dans un tissu mammaire sain, ER α est exclusivement exprimé dans 15 à 30% des cellules épithéliales luminales (Anderson 2002). Approximativement 70% des carcinomes mammaires humains expriment ER α (Stierer, Rosen et al. 1993). L'amplification du gène ESR1 qui code pour ER α est corrélée avec une augmentation l'expression de la protéine et ces changements se produisent très tôt lors du processus de la tumorigenèse (Khan, Rogers et al. 1994; Holst, Stahl et al. 2007). L'augmentation de l'expression de ER α au sein des cellules tumorales les rend plus sensibles aux effets prolifératifs des oestrogènes et leur procurent un avantage sélectif. Cependant, le statut ER+ de ces tumeurs est indicateur de la sensibilité à la thérapie endocrine et améliore les pronostics de survie par rapport aux tumeurs négatives pour l'expression des récepteurs.

3-Ciblage du récepteur des oestrogènes alpha dans les cancers hormono-dépendant

3-1-Développement des anti-oestrogènes partiels de type SERM

Avant l'introduction de divers agents pharmacologiques, la thérapie du cancer du sein fut essentiellement ablative. À l'époque, les chirurgies visaient à éliminer toutes les sources directes ou indirectes d'oestrogènes (ovaire, hypophyse). Les travaux de Jensen au début des années 1970 menèrent au concept selon lequel la présence du récepteur des oestrogènes dans les tumeurs du sein serait une indication pour une réponse à la thérapie endocrinienne ablative (Jensen, Block et al. 1971; Jensen and DeSombre 1971; Jensen, Numata et al. 1971). Dès lors, la détection du récepteur des oestrogènes par le test de liaison du ligand ou par immunocytochimie, fut le test de base pour la prédiction de la sensibilité à la thérapie endocrinienne.

Les observations de Jensen ont fourni le fondement des stratégies thérapeutiques visant l'inhibition de la signalisation par les oestrogènes. Deux approches majeures ont découlé de ces travaux: 1-l'inhibition de la production des oestrogènes par des inhibiteurs des aromatasés. 2-l'inactivation des récepteur des oestrogènes. Les anti-oestrogènes ont été développés dans les années 1950 dans le cadre de la recherche sur la contraception. Des composés anti-oestrogènes non stéroïdiens de type triphenylethylène comme Ethamoxytriphol (MER-25) et chlomiphene (MRL41) étaient de puissants agents contraceptifs dans les modèles animaux mais leur usage à long terme fut restreint à cause d'une toxicité significative (Holtkamp, Greslin et al. 1960; Herbst, Griffiths et al. 1964). Ces deux composés montraient, cependant, des effets considérables sur les tumeurs du cancer du sein (Kistner and Smith 1960) (Holtkamp, Greslin et al. 1960). Au début des années 1970, le tamoxifène (ICI 46,474, Nolvadex) fut introduit comme agent contraceptif ayant un potentiel thérapeutique dans le traitement du cancer du sein (Cole, Jones et al. 1971). Depuis, il constitue l'anti-oestrogène de choix pour traiter les tumeurs ER+ de tous les stades aussi bien chez la femme avant ou après la ménopause (Jordan 2003). Le tamoxifène est utilisé comme un adjuvant dans les stades précoces de la maladie où il permet de réduire le risque du développement de tumeurs primaires contralatérales

(Prentice 1990) et également lors de la prévention chez les femmes issues de groupes à haut risque (Fisher, Costantino et al. 1998).

Dans les années 1990 Eli Lilly introduit l'acronyme SERM pour (Modulateurs Sélectifs du Récepteur des oestrogènes) pour décrire une propriété longtemps associée aux anti-oestrogène de type triphenylethylène, ces composés ont des actions mixtes qui varient selon les espèces et les tissus (Berry, Metzger et al. 1990). Chez la souris, le tamoxifène agit comme un oestrogène au niveau de l'utérus et du vagin alors qu'il est un anti-oestrogène au niveau de la glande mammaire (Harper and Walpole 1966) (Terenius 1971). Le raloxifène (Ral), un autre anti-oestrogène de type SERM, agit comme un oestrogène au niveau du tissu osseux de la rat ovariectomisée tout en exerçant un effet anti-oestrogénique au niveau de l'utérus et la glande mammaire (Harper and Walpole 1967) (Gottardis and Jordan 1987). Ces observations ont été extrapolées au niveau clinique. Chez la femme, le tamoxifène exerce un effet anti-oestrogénique au niveau de la glande mammaire, alors qu'il présente un effet oestrogénique partiel au niveau du tissu osseux et au niveau de l'utérus où son administration corrèle avec 3 à 4 fois d'augmentation du risque du cancer de l'endomètre (Assikis, Neven et al. 1996) (Fisher, Costantino et al. 1998). L'activité oestrogénique du tamoxifène est une activité de type agoniste partielle qui peut s'expliquer par le fait que les anti-oestrogènes de type SERMs, dans certains contextes cellulaires, permettent d'activer la transcription par ER α . Il a été suggéré que le ratio entre les niveaux de co-activateurs et les co-répresseurs dans un type cellulaire donné serait déterminant dans le choix du type de la réponse. La surexpression des co-activateurs dans les cellules MCF7 favorise une réponse de type oestrogénique du tamoxifène (Shang and Brown 2002). Dans les cellules HepG2, la surexpression du co-répresseur SMRT diminue la réponse du tamoxifène et la surexpression de SRC1 inverse le phénomène (Smith, Nawaz et al. 1997).

La fonction d'activation AF-1 est importante dans la réponse sélective des anti-oestrogènes SERMs. Ces composés inactivent la fonction hormono-dépendent AF-2 alors que la fonction AF-1 continue à intégrer les signaux qui proviennent de la voie des MAPK (Bunone, Briand et al. 1996) et la phosphorylation de la sérine S118 située au sein de AF-1 induit l'expression des gènes cibles des oestrogènes (Castano, Chen et al. 1998). Un autre mécanisme décrit un synergisme entre la AF-2 et un domaine hélicale situé au niveau de la

AF-1. Les deux fonctions coopèrent pour recruter le cocativateur SRC-1 ce qui permet d'activer un promoteur sensible au tamoxifène (Metivier, Petit et al. 2000; Metivier, Penot et al. 2001).

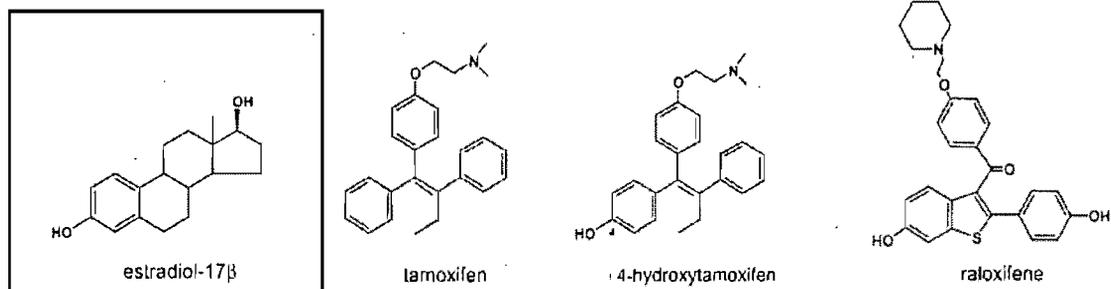
Un autre aspect lié aux anti-oestrogènes de type SERMs est le développement d'un phénomène de résistance. En fait, l'usage du raloxifène pour maintenir une bonne densité osseuse a un effet négatif quand vient le temps de traiter un cancer du sein (O'Regan, Osipo et al. 2006). Un long traitement avec le tamoxifène permet aux cellules MCF7 implantées dans des souris athymiques de recommencer à croître de manière tamoxifène dépendante (Gottardis and Jordan 1988). Les mécanismes de résistance aux SERMs peuvent être d'ordre métabolique. Le tamoxifène a besoin d'être transformé par l'enzyme CYP2d6 en un métabolite actif de forte affinité, 4-hydroxytamoxifène (4OHT) (endoxifène) et des mutations de cette enzyme sont responsables de la réduction de l'efficacité du traitement (Stearns, Johnson et al. 2003; Jin, Desta et al. 2005). Une mutation ponctuelle D351Y au niveau du récepteur des oestrogènes a été isolée des tumeurs de MCF7 qui croissent en présence du tamoxifène (Wolf and Jordan 1994). Un autre mécanisme de résistance décrit une surexpression des récepteurs à EGF, HER-2/*neu* et les co-activateurs (McClelland, Barrow et al. 2001) (Johnston 1997). Plus récemment, on a proposé que la phosphorylation de la sérine 305 du ER α par la Protéine kinase A (PKA) en présence de tamoxifène favorise l'adoption d'une conformation favorable à l'activation de la transcription (Zwart, Griekspoor et al. 2007).

3-2-Mécanisme d'action des anti-oestrogènes de type SERM

Les anti-oestrogènes partiels sont des inhibiteurs compétitifs du récepteur des oestrogènes alpha, tamoxifène et Raloxifène, exercent leur effet antagoniste par le biais de leur chaîne latérale (**Fig.3**) (Jordan and Gosden 1982) (Robertson, Katzenellenbogen et al. 1982). De point de vue structurale, ils se lient au niveau de la cavité de liaison du ligand au sein du LBD, la reconnaissance du ligand se fait par la complémentarité de charge entre l'amine tertiaire de sa chaîne latérale et l'aspartate 351 du LBD, l'hydroxyle phénolique établit des ponts hydrogènes avec la glutamate 353, l'arginine 394 et une molécule d'eau (Brzozowski, Pike et al. 1997) (Shiau, Barstad et al. 1998). À l'exception de l'hélice H12, la structure du LBD est identique dans le cas des complexes ERalpha-E2 et ERalpha-4OHT (**Fig.4**).

En fait, 4-OHT projette sa chaîne latérale vers l'extérieur du LBD entre les hélices H3, H4 et H5, les diméthyles de l'amine tertiaire viennent créer blocage avec la leucine 540 de l'hélice H12 dans sa conformation agoniste. Ceci va dicter à l'hélice une nouvelle conformation de faible énergie dite antagoniste. Au lieu de se replier sur la cavité de liaison du ligand comme dans le cas du complexe ERalpha-E2 (Pike, Brzozowski et al. 1999), l'hélice H12 est repositionnée entre les hélices H3 et H5 au niveau du sillon de recrutement des co-activateurs de manière à mimer ces co-activateurs (Shiau, Barstad et al. 1998). D'autre part, l'hélice H12 contient un motif de type LXXML semblable à la signature moléculaire des co-activateurs de la famille P160/SRC (Heery, Kalkhoven et al. 1997) (Darimont, Wagner et al. 1998).

•Antioestrogènes de types SERM



•Antioestrogènes Totaux

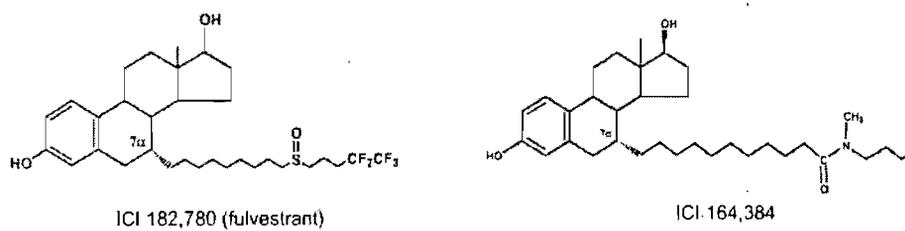


Fig. 3. Les anti-oestrogènes de type SERM et totaux en comparaison avec 17β-estradiol.

La conformation antagoniste de l'hélice H12 est stabilisée par complémentation de charge avec la lysine 362 et la glutamate 380 et l'hélice dirige son côté hydrophobe vers l'intérieur du LBD. Le résultat est une inhibition du recrutement des co-activateurs et une inactivation complète de la fonction d'activation AF-2. (Shiau, Barstad et al. 1998; Pike, Brzozowski et al. 1999). Même si le complexe ERalpha-4OHT est capable se fixer sur l'ADN avec la même affinité que le complexe ERalpha-E2, un recrutement restreint des co-activateurs par la fonction AF-2 et un recrutement des co-répresseurs NcoR et SMRT associés avec une activité HDAC qui condense la chromatine, seraient à la base de l'antagonisme du tamoxifène (Lavinsky, Jepsen et al. 1998; Shang, Hu et al. 2000) (Xu, Stanley et al. 2002; Webb, Nguyen et al. 2003).

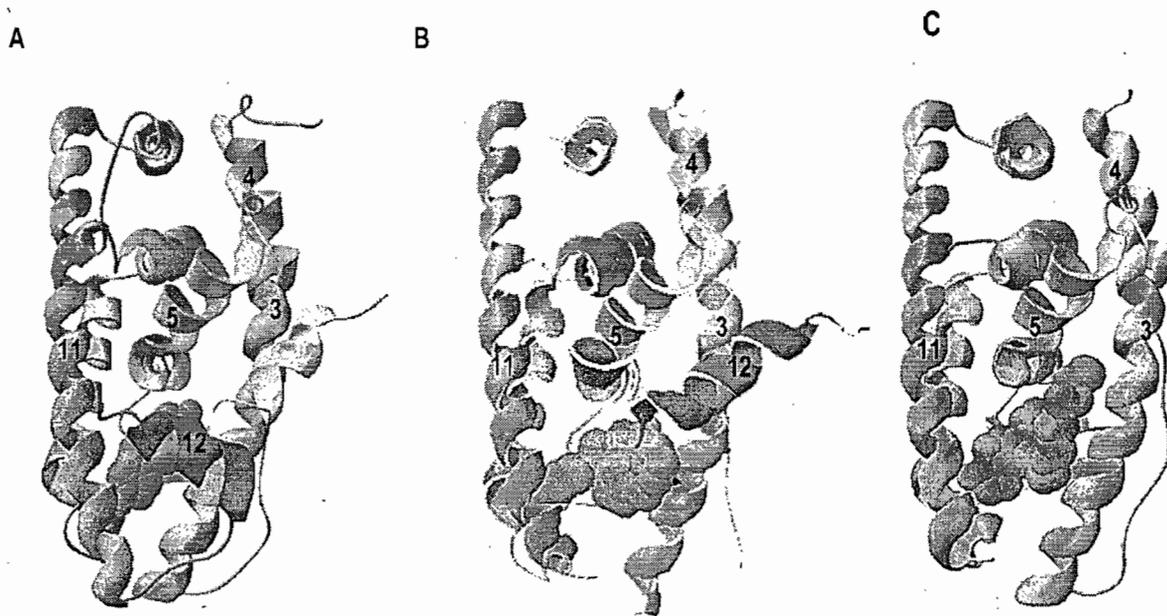


Fig.4. Effet des anti-oestrogènes sur la conformation de l'hélice H12.

A: La conformation de l'hélice H12 au niveau du complexe (LBD-E2) permet de recruter un peptide qui provient du co-activateur GRIP1 (Brzozowski, Pike et al. 1997).

B: L'hélice H12 au niveau du complexe (LBD-4OHT) occupe le sillon du recrutement des co-activateurs formé par H3/H4 et H5 (Shiau, Barstad et al. 1998).

C: conformation du complexe en présence de (LBD-ICI 164 384), la structure de l'hélice H12 n'est pas résolue est la cavité hydrophobe pourrait être exposée (adapté de Pike, Brzozowski et al. 2001).

3-4-Développement des anti-oestrogènes totaux

Les anti-oestrogènes totaux ont été développés pour contrer la signalisation par les œstrogènes. Ils exercent un effet homogène en agissant comme des antagonistes des récepteurs des œstrogènes indépendamment du contexte du tissu ou du promoteur. Cette classe inclus ICI 164, 384, ICI 182, 780 (faslodex, fulvestrant) (**Fig 3**), RU48668, RU39416, EM 139 et EM800. À l'opposé des anti-oestrogènes de type SERMs qui ont une structure à base de triphenylethylène, les anti-oestrogènes totaux sont des analogues du 17 β -estradiol auquel on a greffé une longue chaîne latérale. ICI 164, 384, un analogue 7- α -alkylamide du 17 β -estradiol fut le premier composé de cette classe, il ne montrait aucun effet oestrogénique, bloquait l'effet utero trophique du 17 β -estradiol et du tamoxifène et arrêtait le cycle cellulaire des MCF7 au niveau de la phase G1 (Wakeling and Bowler 1987). ces effets ont été attribués à la capacité de ce composé à inhiber la liaison du ER α à l'ADN *in vitro* et par l'induction des gènes qui bloquent la progression du cycle cellulaire comme p21^{Waf1} (Fawell, White et al. 1990; Varshochi, Halim et al. 2005).

ICI 182, 780 (Faslodex, Fulvestrant) a été développé à partir du ICI 164, 384. Pour augmenter la biodisponibilité et l'affinité, l'amide tertiaire a été remplacée par un groupe polaire et l'alkyle terminale a été remplacée par une fluorine. Le résultat est une affinité qui équivaut à 89% de celle du 17 β -estradiol, une inhibition de 10 fois supérieure de l'effet utero trophique par rapport à ICI 164, 384 et une inhibition de la croissance des cellules MCF7 deux fois meilleur par rapport au tamoxifène (Wakeling, Dukes et al. 1991). Les anti-oestrogènes totaux sont importants du point de vue clinique, ICI182, 780 est utilisé en deuxième ligne pour traiter les tumeurs avancées du cancer du sein ER+ et PR+ chez les femmes en postménopause ayant progressées dans la thérapie conventionnelle à base de anti-oestrogènes de type SERM. Cependant, il n'offre pas l'effet bénéfique que les SERMs exercent sur la densité osseuse (Osborne, 2004)(Buzdar and Robertson 2006; Howell 2006).

3-5-Mécanisme d'action des anti-oestrogènes totaux

La structure cristallographique du récepteur des oestrogènes alpha avec ICI 182, 780 n'est pas résolue et les informations dont on dispose proviennent de la structure cristallographique du récepteur ER β avec ICI 164,384. Le mode de liaison du ligand est entièrement dicté par sa longue chaîne 7- α -alkylamide qui impose une rotation de 180° du noyau stéroïdien de l'anti-oestrogène (Pike, Brzozowski et al. 2001). L'hydroxyle de l'anneau phénolique fait des ponts hydrogènes avec la glutamate 260, l'arginine 301 et avec une molécule d'eau alors que le 17 β hydroxyl maintient son interaction avec l'histidine 430. La chaîne latérale de ICI164, 384 est projetée à l'extérieur du LBD et la structure de l'hélice H12 n'étant pas résolue, suggère une grande mobilité (Fig 4). Des expériences de mutagenèse au niveau de l'hélice H12 montrent son importance dans l'antagonisme de ICI164, 384 (Mahfoudi, Roulet et al. 1995) (Montano, Muller et al. 1995). Il a été suggéré que le non repliement de l'hélice H12 peut provoquer l'exposition de surfaces hydrophobes au niveau de la cavité de liaison du ligand, comme dans le cas du complexe ERalpha-GW5638 ce qui peut affecter la stabilité de la protéine et restreindre le recrutement des co-activateurs (Van Den Bemd, Kuiper et al. 1999; Wu, Yang et al. 2005).

Les anti-oestrogènes totaux exercent leur action principalement au niveau de la protéine sans affecter les niveaux de l'ARNm du récepteur (Wakeling 1995) (Osborne, Coronado-Heinsohn et al. 1995) (McClelland, Gee et al. 1996). ICI182, 780, diminue la présence du récepteur dans le noyau en inhibant son import nucléaire (Dauvois, Danielian et al. 1992) et il déstabilise la dimérisation du récepteur provoquant une réduction de sa demie vie (Dauvois, White et al. 1993) (Parker 1993). En présence de ICI182,780, le récepteur est rapidement polyubiquitiné et dégradé par le proteasome 26S. Les résidus lysines 302 et 303 semblent jouer un rôle (Berry, Fan et al. 2008). Cependant, les résidus clés qui subissent cette modification demeurent inconnus. La dégradation du récepteur s'effectue dans un compartiment nucléaire par une activité protéasique associée au noyau et implique une interaction avec des composantes de la matrice nucléaire (Wijayarathne and McDonnell 2001) (Giamarchi, Chailleux et al. 2002) (Callige, Kieffer et al. 2005) (Long and Nephew 2006). D'autres observations montrent que ICI182, 780 agit sur la dynamique du récepteur au sein du noyau car il induit une immobilisation rapide (Htun, Holth et al.

1999) (Stenoien, Mancini et al. 2000) (Stenoien, Nye et al. 2001) (Matsuda, Nishi et al. 2008). Cette immobilisation corrèle avec un changement des propriétés d'extraction de la protéine (Marsaud, Gougelet et al. 2003; Lipfert, Fisher et al. 2006; Lupien, Jeyakumar et al. 2007).

4-Les complexes du remodelage de la chromatine

4-1-Organisation de la chromatine chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes l'ADN est compacté dans le noyau sous forme de fibres de chromatine avec plusieurs degrés d'organisation dans le temps et l'espace. Cette structure complexe contrôle l'accessibilité de l'ADN aux protéines impliquées dans des processus cellulaires tels que la transcription. Le nucléosome est la forme de base de l'organisation de la chromatine et consiste en un octamère de protéines histones (deux exemplaires de chaque sous-unité H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel environ 146pb d'ADN super enroulé font 1.75 tour (Luger, Mader et al. 1997). Chaque histone présente un domaine central structuré suffisant aux interactions histone-histone et histone-ADN. De plus, les histones présentent une région (queue) qui joue un rôle important dans la formation des structures de chromatine d'ordre supérieur. Les régions amino-terminales des histones sont le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles, par exemple acétylation, méthylation, et phosphorylation. L'acétylation et la méthylation des histones sont corrélées avec l'activation des gènes et sont contrôlée respectivement par des enzymes de type histones acétyltransferase et méthyltransferase comme CARM1 et PRMT. Ces modifications permettent de neutraliser les charges positives des résidus arginines et lysines ce qui diminue l'affinité des histones pour l'ADN et ultimement améliore son accessibilité aux facteurs de transcription (Bradbury 1992) (Steger and Workman 1999).

4-2-Les facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendant

4-2-1-Les complexes de types SWI/SNF

Le complexe SWI/ SNF (switch/sucrose non-fermenting) a été découvert initialement lors d'un criblage au niveau de la levure à la recherche des mutations qui causent un défaut au niveau du gène *SUC2* qui code pour une invertase impliquée dans le métabolisme des glucides (Carlson, Osmond et al. 1981; Winston and Carlson 1992). Les complexes SWI/ SNF de la drosophile, *Brahma*, son homologue humain, hBRM/BRG1 et celui de la levure, RSC, partagent la même sous unité ATPasique homologue à Snf2 du complexe Swi2/Snf2 de la levure en plus d'un bromodomain (Hill 2001). Ensemble, ils forment la sous-famille SNF2 au sein de la famille des SWI2/SNF2 (Lusser and Kadonaga 2003). D'autres sous unités ATPasiques homologues à la sous unité SNF2 sont impliquées dans la formation d'autres complexes de la famille SWI2/SNF2, qui comprend six autres sous-familles: ISWI, CHD1, INO80, CSB, RAD54, DDM1.

Les complexes SWI/SNF humains de la sous famille SNF2 demeurent les plus étudiés. Ils peuvent atteindre 2MDa de taille et peuvent contenir entre 8 et 16 sous unités dont une seule à activité ATPasique (Kingston and Narlikar 1999) (Becker, Tsukiyama et al. 1994) (Aalfs and Kingston 2000). Leurs composantes actives sont très conservées de la levure à l'humain. Ces complexes sont recrutés aux régions régulatrices par des facteurs qui lient l'ADN (Sudarsanam and Winston 2000). Ils se lient à la chromatine avec une affinité nanomolaire et utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour affaiblir les contacts ADN-histones. Ceci peut augmenter jusqu'à 30 fois l'affinité d'un co-activateur pour un site donné (Cote, Quinn et al. 1994). L'activité ATPasique des complexes SWI/SNF est stimulée par l'ADN nu ou les nucléosomes comme substrat. (Boyer, Latek et al. 2004)

4-2-2-Les complexes de type ISWI

Le groupe des complexes ISWI s'appelle aussi le groupe SNF2L (Dirscherl and Krebs 2004). Il se classe au sein de la sous-famille ISWI et partage la sous unité ATPase SNF2 caractéristique de la superfamille des SWI2/SNF2. Les complexes ISWI exercent un large éventail de fonctions au sein de la cellule, incluant l'activation et la répression de la transcription, l'assemblage de la chromatine, le glissement des nucléosomes, la réplication de l'hétérochromatine, et sont aussi impliqués dans la cohésion des chromatides sœurs (Dirscherl and Krebs 2004). Les premiers complexes ISWI, purifiés chez la drosophile ont été nommés *nucleosome remodeling factor* (NURF), *ATP utilizing chromatin assembly* (ACF) et *Chromatin assembly complex* CHRAC (Johnson, Adkins et al. 2005) (**Fig 5**). Ensuite, des homologues ont été identifiés dans de nombreuses espèces. Chez l'humain, la sous-unité ATPasique est SNF2h dans les complexes de type hACF/WCRF, hCHRAC, hWICH, WINAC, NoRC et RSF. Seul le complexe NURF présente une sous unité ATPasique SNF2L. Même s'ils sont de composition similaire, les complexes ISWI montrent des activités différentes. CHRAC et ACF ont tendance à compacter la chromatine et permettent l'assemblage des nucléosomes *in vitro* et *in vivo* (Fyodorov and Kadonaga 2002) (Fyodorov and Kadonaga 2002). NURF pour sa part, agit de manière similaire au complexe de type SWI/SNF en déstabilisant la structure du nucléosome (Becker and Horz 2002) (Gavin, Horn et al. 2001) (Barak, Lazzaro et al. 2003). Contrairement à l'activité ATPasique des complexes SWI/SNF, celle des complexes ISWI est stimulée par des nucléosomes intacts contenant une queue non acétylée de l'histone H4. (Cote, Quinn et al. 1994; Georgel, Tsukiyama et al. 1997).

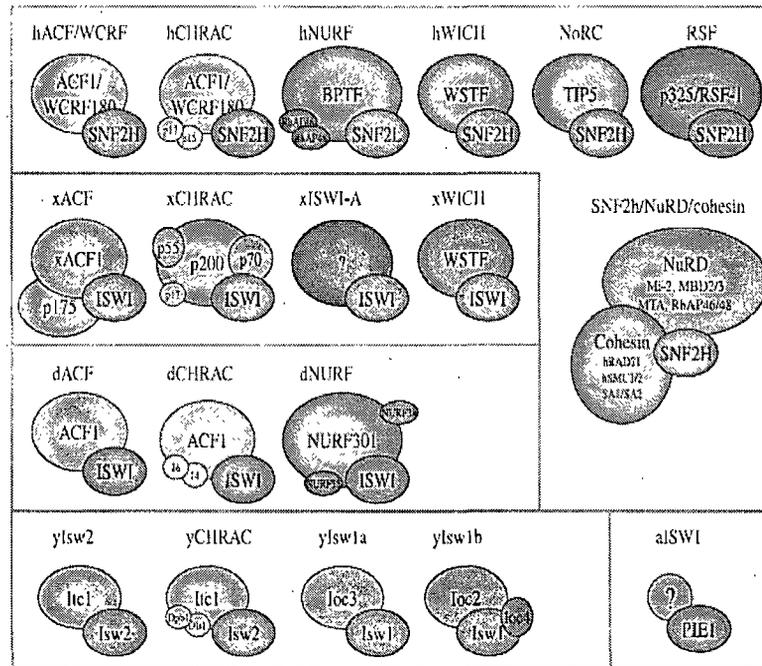


Fig.5. Diversité des complexes de type ISWI (adapté de Dirscherl and Krebs 2004).

4-2-3-Le complexe ACF1/ISWI

Ce complexe est formé d'une sous unité ATPasique ISWI et une sous unité non catalytique ACF1. Dans ce cas, la sous-unité ATPasique est SNF2h. Cette sous-unité présente un domaine amino-terminal de 691 acides aminés qui contient l'essentielle de l'activité catalytique car ce domaine est capable de se lier à l'ADN et au nucléosome mais l'ADN seul n'est pas suffisant pour son activité ATPasique ce qui suggère un rôle important des histones (Georgel, Tsukiyama et al. 1997; Aalfs, Narlikar et al. 2001; Clapier, Nightingale et al. 2002). La région carboxy-terminale se replie en 12 α -hélices et présente (**Fig 6**): un domaine replié en quatre α -hélices et appelé HAND (Grune, Brzeski et al. 2003), situé entre les résidus 697 et 795. Le domaine HAND est suivi immédiatement par le domaine SANT, qui est organisé en trois hélices entre les résidus 796 à 850 et s'apparente au domaine de liaison à l'ADN de c-myb. Il a été suggéré que ce domaine aurait une fonction de liaison de l'ADN (Aasland, Stewart et al. 1996). Cependant, la présence des résidus hydrophobes au niveau de l'hélice 3 et le caractère acide du domaine SANT sont incompatibles avec la fonction de liaison de l'ADN (Boyer, Latek et al. 2004). Il existe un troisième domaine, entre les résidus 886 et 977, qui se replie en trois hélices et ne présente pas la séquence canonique du domaine SANT; pour le distinguer du domaine SANT, il a été appelé SLIDE (SANT like domain). Ce domaine contient des résidus conservés qui se trouvent au niveau du DBD de c-myb et présente une charge nette positive. L'activité de remodelage maximale de ISWI nécessite une séquence à caractère basique (Arginine17 Histidine18 Arginine19) située au niveau de la queue amino-terminale de l'histone H4. En absence de cette région, le nucléosome n'est plus reconnu et l'activité ATPasique est inhibée. La liaison au nucléosome peut être aussi altérée par l'acétylation des lysines adjacentes K12 et K16 (Clapier, Langst et al. 2001) (Clapier, Nightingale et al. 2002). La délétion du domaine SLIDE abolit la liaison à l'ADN et reste inactive même en présence d'un nucléosome intact. Par contre, la délétion du domaine SANT n'affecte pas la liaison à l'ADN mais l'activité ATPasique est nulle même en présence d'un nucléosome intact. Ceci suggère un mécanisme où la reconnaissance de l'ADN est assurée par le domaine SLIDE alors que le domaine SANT constitue le module de reconnaissance de la queue de l'histone H4 (Grune, Brzeski et al. 2003) (Boyer, Latek et al. 2004).

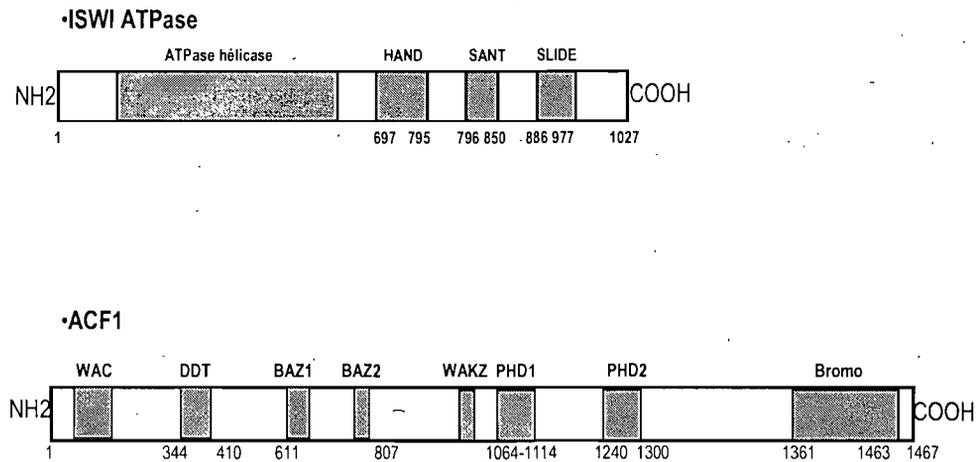


Fig.6. Domaine des sous unité du complexe hACF.

La sous-unité catalytique des complexes ISWI joue un rôle important dans le développement. Chez la souris, l'inactivation du gène *Snf2h* (*Snf2h*^{-/-}) induit la mortalité des embryons avant la préimplantation et chez l'humain, l'inactivation du gène au niveau des cellules souches hématopoïétiques inhibe la capacité des progéniteurs CD34⁺ à activer l'érythropoïèse (Stopka and Skoultschi 2003). SNF2h constitue une cible des facteurs de transcription E2F suggérant un rôle dans le cycle cellulaire (Collins, Poot et al. 2002; Weinmann, Yan et al. 2002). SNF2h joue un rôle important dans la répression par les récepteurs nucléaires en absence de ligand. Le complexe N-CoR/HDAC3 s'associe avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne, la désacétylation permet de recruter SNF2h au niveau de l'histone H4 du nucléosome et le ciblage de HDAC3 par des siRNA inhibe ce recrutement (Alenghat, Yu et al. 2006).

La sous-unité non catalytique du complexe ACF1/ISWI est ACF1, aussi appelée WCRF180 et BAZ1A. Le gène *acf1* code pour une protéine d'environ 180 kDa qui a plusieurs motifs conservés : WAC, WAKZ, DDT, bromodomaine et des doigts PHD (Ito, Levenstein et al. 1999; Fyodorov and Kadonaga 2002; Fyodorov and Kadonaga 2002) (**Fig 6**). Il existe un motif de type LXXLL caractéristique des interactions avec les récepteurs nucléaires, BPTF qui est l'équivalent de ACF1 au sein du complexe hNURF contient trois motifs LXXLL (Barak, Lazzaro et al. 2003). Le complexe formé d'ACF1 et de SNF2h nécessite une interaction entre une région carboxy-terminale de SNF2h et les acides

aminés 962 et 991 et les motifs DDT et bromodomaine de ACF1 (Eberharter, Vetter et al. 2004). Le domaine PHD pourrait aussi jouer un rôle dans cette interaction (Fyodorov and Kadonaga 2002). Du point de vue mécanistique, ACF1 exerce un effet allostérique sur SNF2h et permet d'augmenter l'efficacité de la translocation de l'ADN vers les octamères d'histones sans augmenter la quantité d'ATP hydrolysé par SNF2h. ACF1 interagit avec les octamères d'histone et constitue un point d'ancrage pour SNF2h. Ce dernier à l'aide du domaine SLIDE va se lier à l'ADN et à l'histone H4 par le domaine SANT. L'énergie de l'hydrolyse de l'ATP est convertie en un mouvement de torsion qui est propagé autour du nucléosome par la sous unité ACF1 (Eberharter, Ferrari et al. 2001).

L'inactivation du gène *acf1* chez la drosophile induit une mortalité élevée à l'état larvaire due à une diminution de la périodicité des nucléosomes. Au niveau de la transcription, la sous-unité ACF1 participe à la répression exercée par le complexe *Polycomb (PcG)* sur le gène *Ubx*. Au niveau des thymocytes, ACF1 et SNF2h sont recrutés par une protéine d'échafaudage de la matrice nucléaire (SATB1) pour exercer une répression sur le gène *IL2Ra* (Yasui, Miyano et al. 2002) et au niveau de la signalisation par les récepteurs nucléaires, le complexe ACF1 permet de stabiliser le complexe répresseur formé par NcoR-HDAC et le récepteur de la vitamine D3 (VDR)(Ewing, Attner et al. 2007).

Les observations précédentes indiquent que le complexe ACF1 est impliqué dans l'établissement et la maintenance de l'hétérochromatine. Cependant, le complexe peut remodeler l'hétérochromatine pour la rendre accessible lors de la réplication et joue de ce fait un rôle au niveau du cycle cellulaire. La réduction des niveaux d'ACF1 et de SNF2h par des ARN d'interférence induit une accumulation des cellules HeLa en fin de phase S lors de la réplication et quand l'hétérochromatine est décondensée par des agents chimiques, l'effet de la déplétion de SNF2h et ACF-1 sur le cycle cellulaire ne se fait plus sentir. Ceci suggère que le complexe joue un rôle dans la réplication de l'hétérochromatine par un effet sur les nucléosomes pour favoriser l'avancement de la fourche de réplication (Collins, Poot et al. 2002).

Hypothèse et objectifs

Les récepteurs des oestrogènes sont des facteurs de transcription hormono-dépendant qui régulent l'expression de nombreux gènes importants dans la physiologie des tumeurs mammaires. Les anti-oestrogènes constituent la première ligne thérapeutique pour traiter les tumeurs mammaires ER+. Ces molécules se lient aux récepteurs des oestrogènes et provoquent l'inhibition des voies de signalisations gouvernées par ces récepteurs. (ICI 182, 780, Fulvestrant, Faslodex) (ICI) est un anti-oestrogène total qui a démontré un potentiel thérapeutique dans le traitement des tumeurs qui résistent au traitement par l'anti-oestrogène partiel tamoxifène. ICI présente l'avantage d'exercer un effet homogène dans tous les tissus à l'opposé tamoxifène et raloxifène qui peuvent présenter des effets agonistes partiels selon le tissu et le contexte cellulaire. Le mécanisme d'action de ICI n'est pas complètement résolu, ce composé est un analogue du 17β -estradiol auquel on a greffé une longue chaîne latérale, il agit comme un inhibiteur compétitif de ER α et provoque une dégradation rapide du récepteur par le proteasome 26S. Cette dégradation s'effectue au noyau, elle corrèle avec l'absence du récepteur au niveau des éléments de réponse aux oestrogènes et se traduit par la perte de l'induction des gènes cibles des oestrogènes. ICI induit un recrutement des corépresseurs de la transcription et induit une immobilisation du récepteur sur des composantes de la matrice nucléaire. D'autres résultats ont suggéré que cette immobilisation est préalable à la dégradation.

De point de vue structural la chaîne latérale de ICI cause blocage stérique avec l'hélice H12 du domaine de liaison du ligand (LBD) de ER α . Ce nouveau repliement serait à la base du mécanisme d'action de ICI. L'hélice H12 étant le déterminant moléculaire le plus important à la fois pour la transactivation et pour l'interaction avec les composantes de la matrice nucléaire. Dans le même sens, nos données de modélisation moléculaire préliminaires suggèrent que les résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12 notamment L536, L539 et L540 jouent un rôle important dans le blocage stérique avec la chaîne latérale de ICI.

Hypothèse: Les mécanismes de répression par les anti-oestrogènes totaux impliquent un rôle important des résidus longs de l'hélice H12 du domaine de liaison du ligand du récepteur des oestrogènes α .

Objectifs spécifiques: Les cellules MCF7 sont un modèle de cellules de carcinomes mammaires qui expriment le récepteur des oestrogènes de manière endogène, elles permettent d'étudier les effets des anti-oestrogènes dans un contexte naturel sans surexpression artificielle. Nous disposons également de modèles cellulaires négatifs pour l'expression du récepteur. Les cellules HepG2 sont un modèle cellulaire intéressant car elles permettent de discriminer entre les anti-oestrogènes totaux comme ICI et les anti-oestrogènes partiels comme tamoxifène alors que raloxifène se comporte comme un anti-oestrogène total dans ce système. D'autre part, ce type cellulaire nous procure la possibilité d'introduire individuellement des formes mutées du récepteur et d'étudier leur comportement

1- Dans un premier temps, nous allons étudier les propriétés de transactivation, d'extraction et de mobilité du récepteur sauvage dans les lignées ER- (HepG2 et HEK293) et ER+ (MCF7) en présence des hormones et des anti-oestrogènes. En parallèle, nous allons étudier les effets des anti-oestrogènes sur la localisation cellulaires du récepteur.

2- Pour caractériser le rôle de l'hélice H12 dans les mécanismes d'actions des anti-oestrogènes totaux, nous allons étudier les effets des mutants des résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12 (L536, L539 et L540) sur la transactivation, l'extraction et la mobilité du récepteur en présence des anti-oestrogènes.

3- Nous allons utiliser une approche de purification en tandem pour identifier les composantes cellulaires qui interagissent avec le récepteur des oestrogènes en présence des anti-oestrogènes totaux.

Matériels et méthodes

1-Réactifs et plasmides

17 β -estradiol (E2), 4-hydroxytamoxifène (OHT) et Raloxifène (Ral) sont obtenus de Sigma, ICI 182,780 (ICI) est obtenu de (Tocris cookson) RU 58668 est un produit de (Roussel UCLAF). Les cellules ont été toujours traitées avec le solvant ou les ligands à des concentrations finales de (E2: 25 nM, OHT: 100nM, ICI182, 780: 100nM, Raloxifène: 100 nM, RU39446: 100nM ou RU 586668: 100nM).

Les constructions pSG5/HEG0 et pEGFP-reel-pC-3xFlag ont été respectivement des dons du professeur Chambon (Strasbourg, France) et du Dr Sylvain Meloche (Montréal, Canada). Les mutations L536A, L539A et L540A ont été introduites dans le vecteur pSG5/HEG0 par mutagenèse dirigée. Pour créer les protéines de fusion à la EYFP utilisées lors des expériences de FRAP, HEG0 ainsi que les mutants L536A, L539A et L540A ont été sous clonés, sans le codon stop, entre les sites XhoI/EcoRI du vecteur pCDNA3/EYFP-N1-Topaz (Perkin Elmer).

Pour identifier les régions nécessaires à l'insolubilité du récepteur des oestrogènes en présence des anti-oestrogènes des fragments PCR qui correspondent au domaine CDEF du récepteur ont été clonés au niveau du vecteur pSG5 au niveau des sites EcoRI.

Afin de réaliser des purifications de complexes protéiques, HEG0 et HEG0/ (L539A) ont été sous clonés dans le vecteur d'expression pCDNA3/EGFP-reel-pC-3xFlag qui offre des possibilités de purification en tandem. Des fragments de PCR issus de la digestion ont été ligués à la place de la EGFP en phase avec la protéine C, entre les sites PmeI et PacI. Des clones de chaque construction et de chaque mutant ont été vérifiés par digestion diagnostic et par séquençage.

2-Culture cellulaire

Les cellules HepG2 sont des cellules de carcinome hépatocellulaire et les cellules HEK293 sont des cellules immortalisées du rein. Ces deux lignées cellulaires sont des modèles qui n'expriment pas ER α . Elles sont maintenues de manière routinière dans du milieu DMEM rouge complété avec 10% du sérum fœtal bovin (FBS), de 1% d'antibiotique Pénicilline Streptomycine respectivement à 10000 IU et 10 μ g/ml. Les cellules HepG2 et les cellules HEK 293 sont passées deux fois par semaine respectivement avec des dilutions de 1:4 et de 1:5.

Les MCF7 sont des cellules de carcinome mammaire qui expriment ER α , Elles sont maintenues dans du milieu AMEM rouge complété comme ci-haut de plus, 2% de Glutamine 200mM (Multicell) est ajouté au milieu. Toutes les lignées cellulaires sont incubées dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% CO $_2$.

Au moins 48h avant chaque expérience, les cellules sont passées dans du milieu DMEM blanc complété avec 10% de sérum fœtal bovin traité au charbon (FBST), 1% d'antibiotique Pénicilline Streptomycine et 2% L-Glutamine 200mM (Multicell). Un milieu blanc est utilisé pour éviter l'activité oestrogénique du rouge de phénol présent dans les milieux de culture rouges, le traitement du sérum au charbon est nécessaire pour enlever une grande partie des stéroïdes à fin de maintenir le bruit de fonds à un niveau très bas et de bien distinguer l'effet des ligands

3-test de transactivation sur vecteur rapporteur

48 h au moins après avoir passé les cellules HepG2 dans un milieu DMEM blanc complet, elles sont récoltées et comptées. Chaque électroporation est effectuée sur 10 millions de cellules en utilisant un électroporateur Gene Pulser (BioRad). 2 μ g d'ADN du vecteur vide ou du récepteur sont nécessaires par 10 millions de cellules. Les cellules sont mise en contact avec une solution d'un volume final de 100 μ l qui contient 2 μ g du récepteur, 4 μ g du vecteur rapporteur pERE3-TATA-luc, 4 μ g de pCDNA3/ β -galactosidase (contrôle interne), 70 μ g de l'ADN non codant du sperme de saumon (Invitrogen) et 7 μ l de NaCl 5M.

Le mélange est transféré dans une cuvette d'électroporation qui est soumise à un champ électrique de 240 V et 950 μ F. Le contenu des cuvettes est ensuite centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes, les culots cellulaires sont re-suspendues dans du milieu de culture etensemencés dans des plaques de 6 puits (Corning) avec une densité de 1million/puit. Immédiatement, les cellules sont traitées avec le solvant, ou les ligands aux concentrations mentionnées ci-haut.

48 heures plus tard, le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées 2 fois au PBS 1X froid. Les protéines sont extraites en ajoutant 200 μ l par puit de tampon de lyse (Tris 100 mM pH 7,9 0,5% NP-40, 100mM DTT) et en incubant 5 minutes à la température de la pièce. 40 μ l de chaque extrait cellulaire sont déposés sur une plaque de plastique opaque de 96 puits. La réaction enzymatique est amorcée par l'ajout de 100 μ l de substrat (1 mM D-luciférine, 4 mM ATP, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM coenzyme A préparée dans du tampon Tris 100 mM pH 7,9) La luminescence issue de l'oxydation de la luciférine par la luciférase est mesurée à 480 nm en utilisant le LuminCount (Packard). L'efficacité de la transfection et les niveaux d'activité de la luciférase sont corrélés au niveau de l'expression de la β -galactosidase; 40 μ l d'extraits cellulaires auxquels on a ajouté 128 μ l de tampon Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoéthanol) et 32 μ l du substrat β -D-galacto-pyranoside (ONPG) à 4 mg/ml préparé dans le tampon Z. L'activité β -galactosidase est mesurée par dosage colorimétrique à 420nm à l'aide de l'appareil SpectroMax 160 de (Molecular Devices).

4- Essai d'extraction différentielle du récepteur des oestrogènes alpha

2 μ g du vecteur vide ou du récepteur sauvage ou mutant sont transfectés par 1 million de cellule à l'aide d'un électroporateur, ensuite 5 millions de cellules par condition sontensemencées dans des plats de pétri de 10 cm (Corning), 24h plus tard, les cellules sont traitées avec le solvant ou les ligands. Deux jours après la transfection, les pétris sont rincées au PBS 1X froid et les cellules sont récoltées dans 1 ml de PBS 1X ensuite culottées par une centrifugation de 1000 g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires correspondant à chaque condition de traitement sont divisés en deux parties égales. Une deuxième centrifugation est utilisée pour récupérer les cellules. Les culots cellulaires issus des deux parties sont soumis à une extraction différentielle, la moitié est lysée avec un tampon high

salt buffer (HSB) (400mM KCl, 20% glycérol, 20 mM Tris pH7,5 complété par un cocktail d'inhibiteur de protéase et d'agent réducteur (2mM DTT, 2 µg/ml Aprotinine et Leupeptine et de 0,18 µg/ml PMSF). Pour éclater les noyaux des cellules, les échantillons sont soumis à 3 cycles de gel sur la carboglace intercalés par 3 cycles de dégel sur la glace. Après une centrifugation de 16000 g pendant 15 minutes, le surnageant est collecté c'est la fraction soluble dans le HSB. L'autre moitié est re-suspendue dans du PBS 1X froid.

Les protéines de la fraction soluble et de la fraction totale sont quantifiées par la méthode de Bradford (BioRad). Des volumes qui correspondent à des quantités égales de protéines sont prélevés et soumis à la dénaturation par le tampon Laemmli (200mM Tris pH6,8, 20% glycérol, 2,5% SDS, 5% beta-mercaptoéthanol et 0,015% bleu de bromophénol). Les échantillons sont chauffés à 100 °C pendant 5 minutes.

Pour le test des tampons d'extraction à 1% NP40 et à 1% NP40, 0,5% Triton X-100 et 0,5% SDS sur la fusion HEG0-pC-3xFlag. Les cellules HepG2 ont été transfectées et traitées pour 1 heure ou 16 heures avec le solvant ou les ligands. Elles étaient ensuite récoltées de la même façon et lysées avec le tampon avec NP40 1% 20mM Tris, 150mM NaCl 2mM EDTA, 100mM NaF, 100mM Sodium Pyrophosphate, 10mM β glycérophosphate ou le tampon à base de NP40 1%, 0,5 Triton X-100, 0,5% SDS, 50 mM Tris pH7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA et 1mM Na₃VO₄. Les deux tampons ont été complétés par un cocktail d'inhibiteurs de protéase. Des quantités égales de protéines (50µg) ont été déposées sur des gels SDS-PAGE et ensuite analysées par immunobuvardage.

5-SDS PAGE et immunobuvardage de type westren

Les échantillons sont déposés sur des gels dénaturant de 8% d'acrylamide et leur contenu en protéines est soumis à une séparation selon le poids moléculaire dans des cuves de Mini-Protean III (BioRad). La migration est effectuée à 100V est arrêtée une fois que le bleu de bromophénol sort du gel. Des membranes de PVDF (Millipore) sont préalablement équilibrées avec du méthanol puis avec le tampon de transfert (25 mM Tris, 150 mM glycine, 20% méthanol).

Les sites non spécifiques sont bloquées par une solution de PBS contenant 0,2% de tween (PBST) et 5% de lait déshydraté pendant une nuit à 4°C. La membrane est rincée 3 fois avec du PBST pendant 10 minutes et incubée 2 heures à température de la pièce avec les anticorps primaire anti-ER α (B10), anticorps monoclonal de souris, (don du Dr Pierre Chambon), ou 30 minutes avec un anti- β -Actine, anticorps monoclonal de souris (Sigma). Les concentrations d'anticorps utilisées sont respectivement (1:5000) (1:10000). Les anticorps anti CK5/8 et CK18 sont des anticorps monolonaux de souris (Sigma) et sont utilisés à (1:1000) pendant 1h à température de la pièce. Les anticorps primaires sont préparés dans solution du PBST contenant 3% BSA et 1% de l'azide de sodium.

La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 10 minutes avec 40 ml de PBST à la température de la pièce. Le second marquage s'effectue avec des anticorps secondaires appropriés à l'espèce des anticorps primaires couplés à la HRP (Sigma) 1 :10 000 dilué dans PBST contenant 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 40 minutes à température de la pièce. La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 10 minutes avec 40 ml de PBST à la température de la pièce. Le marquage est ensuite révélé par luminescence en utilisant la trousse de réactifs ECL et des films Kodak BioMax XAR (Perkin Elmer)

Les immunobuvardages ont été réalisés pour confirmer les partenaires de ER α en présence de ICI les anticorps primaires: anti-WCRF180 anticorps polyclonal de chèvre (Santa Cruz), anti-SNF2h, anticorps polyclonal de lapin (Abcam), anti Brg1/Brm, anticorps polyclonal de lapin et anti Rbp46/48, anticorps monoclonal de souris (don du Dr. Julie Lessard)

6- Immunofluorescence et FRAP

Après deux jours dans du DMEM blanc complet, les cellules ont été transfectées par ER α sauvage ou mutant et la EYFP. Les cellules ont étéensemencées dans des plats de pétri de 35 mm γ -irradiées (MaTek) à une densité de 3000Cellules/ cm² dans 2ml du milieu DMEM blanc complet. 24 heures plus tard, les cellules sont traitées pour une durée de 16 heures avec le solvant ou les ligands. Les pétris sont lavés deux fois avec le PBS 1X froid et les cellules sont fixées avec 3% paraformaldehyde dans du PBS durant 15 min. Après la fixation, les cellules ont été perméabilisées et les sites non spécifiques bloqués avec une solution du PBS 1X contenant 0,2% BSA et 0,3% Triton X-100 pour 10 min à la température de la pièce. Les anticorps anti ER α et l'anticorps secondaire Alexa Fluor^R 595 nm ont été utilisés à des dilutions de 1:800 et 1:2000 respectivement dans le PBS contenant 0,2% de BSA.

Les noyaux ont été marqués pendant 5 minutes par 50 ng/ml of Hoeschst 33342 (Sigma) dans le PBS contenant 0,2% de BSA. Finalement, les plats de pétris ont été lavés deux fois avec du PBS 1X et une fois avec de l'eau. Le montage a été fait en utilisant ProLong Gold (Invitrogen). À l'aide d'un microscope confocal Meta^{MK4}, les cellules ont été visualisées et les images ont été analysées par le logiciel LSM 3.2.

L'analyse FRAP a été réalisée sur les cellules HepG2 vivantes transfectées par ER α sauvage ou mutant fusionné à EYFP et traité comme il a été décrit ci-dessus.

Une section qui équivaut à 25% (ROI) est balayée par un laser provenant d'une lampe d'argon à une longueur d'onde de 488 nm et d'une fréquence de 200 itérations.

Simultanément, l'émission qui correspond à la fluorescence de la EYFP est capturée automatiquement avec une intervalle de 4 secondes à l'aide d'un filtre LP 500 nm et un détecteur de type photomultiplicateurs (PMT). Les images de 12 bits sont exportées sous une extension Tif. Les fluorescences de la région d'intérêt (ROI) et de la cellule entière sont quantifiées par Meta Imaging Series 6.1. Les données brutes ont été analysées par Prism Graph Pad.

La fluorescence relative est calculée comme suite :

$$\text{RFU: } \frac{(Z_i - Z_0)}{Z_{\text{ori}}} \frac{(C_i - C_0)}{C_{\text{ori}}}$$

Z_i : la moyenne de l'intensité de ROI à un temps donné.

Z_0 : intensité de la fluorescence dans ROI immédiatement photobleaching.

Z_{ori} : intensité de la fluorescence dans ROI avant photobleaching.

C_{ori} : intensité moyenne de la fluorescence de la cellule avant photobleaching.

C_0 : intensité moyenne de la fluorescence de la cellule immédiatement après photobleaching.

C_i : intensité moyenne de la fluorescence de toute la cellule à un temps donné.

7-Transfection des cellules HEK 293, préparation des extraits cellulaires et immunoprécipitation

Après deux jours dans du DMEM blanc complet, les cellules sont récoltées comptées etensemencées à une densité de 11×10^6 cellules/ pétri de 15 cm (Sarstedt).

Le lendemain, le milieu est aspiré et remplacé par 12 ml de milieu frais. Les cellules sont ensuite transfectées par le réactif polyéthylénimine (PEI) en utilisant $1 \mu\text{g}$ d'ADN / million de cellules et un ratio 1:1 du NaCl 150 mM et du PEI $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Pour les 24 dernières heures de la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu qui contient 0,5% de sérum foetal bovin traité (FBST). Le jour de la récolte, les cellules sont traitées durant 1 heure avec le solvant ou les ligands.

Les cellules sont récoltées dans du PBS 1X froid par une centrifugation de 5min à 1000 g. La lyse des cellules est effectuée par un tampon à base de NP40 1% 20mM Tris, 150mM NaCl 2mM EDTA, 100mM NaF, 100mM Sodium Pyrophosphate, 10mM β glycérophosphate, le tampon est complété par un cocktail d'inhibiteurs, Pepstatine $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, Aprotinine et Leupeptine $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ et PMSF $0,18 \mu\text{g}/\text{ml}$, de plus, les ligands correspondant à chaque condition de traitement sont toujours maintenus lors de la lyse, lors de l'immunoprécipitation et lors des lavages. Après 20 minutes de lyse à 4°C les lysats sont centrifugés à 11000 g et les fractions solubles sont récupérées et leurs protéines totales sont quantifiées par la méthode de Lowry (BioRad).

Lors des expériences d' immunoprécipitation en vue d'analyser l'effet de la signature pC-3xFlag sur la spécificité de l'immunoprécipitation, la procédure expérimentale est la même sauf que l'anticorps utilisé est un anti-ER α de lapin (HC-20) (Santa Cruz). Les échantillons ont été lavés et élués de la même manière. Les niveaux de protéines ont été analysés par immunobuvardage à l'aide des anticorps correspondants à WCRF180, SNF2h, ER α et β -actine.

Lors de l'immunoprécipitation en vue d'analyse par spectroscopie de masse, les expériences ont été réalisées sur 12mg d'extrait total en utilisant un anticorps anti Flag M2 de souris couplé de manière covalente aux billes d'agarose (Sigma). Les billes sont préalablement équilibrées avec le tampon de lyse et sont ajoutées aux échantillons qui seront soumis à une immunoprécipitation durant 16h à 4°C . Le lendemain, les billès sont

récoltées par une centrifugation de 5 minutes à 4500 g, trois lavages par inversion de tube sont effectués suivis d'une brève centrifugation de 30 secondes à 4500g. Pour une analyse de type immunobuvardage, les complexes sont détachés des billes en ajoutant du tampon Laemmli et en chauffant 5 minutes à 100 °C.

D'autres étapes de purification sont requises afin d'améliorer la spécificité. La protéase AcTEV (invitrogen) est une protéase qui reconnaît la séquence d'acides aminés Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly et clive entre les acides aminés Gln et Gly, l'AcTEV porte aussi une signature poly-histidine au niveau de sa région amino-terminale ce qui permet sa précipitation de manière sélective après la réaction de clivage. Après les lavages, les billes sont équilibrées avec le tampon de TEV (50mM, 150mM NaCl, 0,5mM EDTA, 1mM DTT et l'inhibiteur E-64 1µM) ensuite la réaction de clivage est effectuée dans 300 µl de tampon TEV contenant 100 unités de l'acTEV (10U/ µl) durant 2h à 4C⁰. L'éluat, est collecté après une centrifugation de 4500 g pendant 30 secondes et une autre réaction de clivage est relancée pour une durée de 16h à 4C⁰. Le lendemain les deux éluats sont rassemblés en une seule fraction et sont incubés ensuite pendant 1h à 4C⁰ avec des billes qui contiennent du Nickel (Qiagen). Ces billes sont préalablement équilibrées avec le tampon His (50mM, 150 mM NaCl).

Les éluats sont collectés et concentrés sur un centricon (Millipore), les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (BioRad). Après dénaturation, les échantillons sont soumis à une séparation sur un gel SDS PAGE de 8% d'acrylamide.

Toutes les solutions de la coloration au nitrate d'argent sont préparées avec de l'eau MilliQ et des précautions ont été prises pour minimiser la contamination par les kératines. Tout d'abord, le gel est incubé durant une heure dans une solution de fixation (50 % éthanol, 5% acide acétique). Ensuite, 3 lavages de 20 minutes sont effectués avec une solution de 50% éthanol, le gel est ensuite sensibilisé pendant 1minute par une solution de Na₂S₂O₃ 0,02% après lavage avec de l'eau, les gels sont incubés avec une solution de nitrates d'argent 0,1% pendant 20 minutes. La décoloration est effectuée avec une solution de 3% Na₂CO₃ , 0,05% formaldéhyde et la réaction est arrêtée par de l'acide acétique à 5% et les gels sont stockés dans une solution de 1% acide acétique à 4⁰C.

Les bandes d'intérêt sont excisées et éluées du gel d'acrylamide. Les peptides sont digérés par la trypsine et analysés par spectroscopie de masse nano liquide (nanoLC-MS). Le système contient un chromatographe liquide nano-LC (Eksigent), un spectromètre LTQ-orbitrap (Thermo Fisher) et une source d'ionisation de type électroévaporateur. L'acquisition est effectuée avec une résolution de 60 000 suivie d'un balayage par trois MS/MS, seuls les ions chargés de plus de 10 000 ont été sélectionnés pour le séquençage. Les fragments peptidiques générés sont utilisés pour interroger une base de données humaine non-redondante (IPI version 3.24 novembre 2006) à l'aide d'un programme Mascot (Matrix Science). Le seuil de tolérance des fragments parentaux et ioniques ont été fixés respectivement à +/- 0.4 et 0.1 Da. L'attribution des sites de modifications post traductionnelles est validée après une vérification manuelle des spectres MS/MS d'intérêt.

Description et analyse des résultats

1-Les anti-oestrogènes totaux modifient le profil d'extraction en absence de détergents de ER α dans les cellules HEK293 et HepG2 transfectées de manière transitoire

Les cellules HepG2 sont négatives pour l'expression de ER α et sont un bon modèle pour étudier l'effet des anti-oestrogènes sur les propriétés de transactivation de ce récepteur (Metivier, Stark et al. 2002; Castro-Rivera and Safe 2003). Un test luciférase est un outil pour étudier l'activation de la transcription par les facteurs de transcription qui lient l'ADN. Pour ER α , le test consiste à placer un gène rapporteur qui code pour la luciférase en aval d'un promoteur minimal qui contient trois éléments de réponse aux oestrogènes (ERE) et une boîte TATA. Le récepteur est exprimé de manière transitoire et sa capacité à activer la transcription du gène de la luciférase est examinée en présence des ligands ou du solvant de ces ligands (éthanol/DMSO).

Les cellules ont été transfectées avec le vecteur d'expression pour ER α pSG5-HEG0 ou le vecteur parental pSG5, le vecteur rapporteur ERE3-TATA-Luc et un vecteur d'expression pour la β -Galactosidase comme le contrôle interne d'efficacité de transfection, puis incubées pendant la durée de la transfection avec les ligands ou le solvant (**Fig7A et 7B**). Le traitement par E2 induit un effet agoniste qui se manifeste par une augmentation de 8 fois du signal par rapport à l'activité basale du récepteur en présence du solvant.

Une caractéristique des cellules HepG2 est d'exprimer une activité partielle en présence de OHT. Cette activité n'est pas observée au niveau des cellules HEK293 et est attribuée à une fonction AF-1 permissive au recrutement des co-activateurs transcriptionnels au sein des cellules HepG2 (Berry, Metzger et al. 1990; Metivier, Penot et al. 2001; Merot, Metivier et al. 2004). L'incubation avec ce composé résulte en une activité partielle intermédiaire entre celle observée avec le solvant et E2. ICI ne permet d'avoir aucune activité transcriptionnelle et son effet, dit antagoniste, est homogène indépendamment de la lignée cellulaire est caractéristique des antioestrogènes totaux. Quant au, raloxifène, même s'il fait partie des antioestrogènes de type SERM, il ne présente aucune activité agoniste à l'instar de OHT et il se comporte comme un anti-oestrogènes total au niveau des deux lignées cellulaires.

Parallèlement au test de transactivation sur un vecteur rapporteur, les niveaux d'expression du récepteur ont été examinées en présence des ligands dans un tampon riche en sel (high salt buffer, HSB) utilisé couramment pour extraire les facteurs de transcription qui lient l'ADN (fraction soluble) ou un tampon dénaturant contenant 2,5 % de SDS (fraction totale) (**Fig7C et 7D**). Le traitement par OHT résulte en une augmentation des niveaux du récepteur par rapport au solvant et à E2. Par contre, le traitement par ICI induit une disparition complète des épitopes de ER α de la fraction soluble. Ral a des effets similaires avec des niveaux de récepteur intermédiaires entre ceux observés en présence de ICI et le solvant. La disparition du récepteur en présence de ICI est souvent interprétée comme une induction de la dégradation du récepteur, qui a été décrite dans des tissus ou cellules exprimant ER α (Dauvois, Danielian et al. 1992; Wijayaratne and McDonnell 2001). Cependant, sachant qu'une aggrégation du récepteur a aussi été décrite dans certaines lignées cellulaires transfectées en présence d'anti-oestrogènes totaux (Devin-Leclerc, Meng et al. 1998) (Lipfert, Fisher et al. 2006) et que le tampon riche en sel ne contient pas de détergents, une extraction totale s'imposait pour mieux comprendre l'effet des anti-oestrogènes ICI et Ral sur le récepteur dans ces lignées cellulaires.

Quand une extraction totale des cellules HepG2 et HEK 293 est réalisée, on peut observer que les niveaux de récepteur en présence de ICI et Ral ne sont pas inférieurs à ceux en présence du solvant, indiquant qu'une dégradation du récepteur n'est pas la cause de sa disparition après incubation avec ICI et Ral et extraction dans le tampon riche en sel (HSB). Ce phénomène d'insolubilité dans le tampon HSB pourrait être dû à une aggrégation du récepteur dans le cytoplasme, tel que décrit précédemment. Une question s'est posée est ce que ce phénomène d'insolubilité est du à un changement de localisation de ER α ou à un changement de sa distribution au sein du noyau, c'est-à-dire la formation de microaggrégats qui rendent le récepteur résistant à l'extraction par un tampon qui ne contient pas de détergent. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences de localisation cellulaire de ER α en présence du véhicule ou des antioestrogènes ont été réalisées (**Fig 8**).

En présence du solvant ou des anti-oestrogènes, le signal qui provient de la YFP (Yellow fluorescent protein) est réparti au niveau de toute la cellule alors que le marquage qui provient de ER α est strictement nucléaire dû à la présence du signal de localisation nucléaire. Un faible pourcentage des cellules, soit 8% et 2,5% respectivement pour ICI et

Ral, montrent des microagrégats cytoplasmiques. La formation des agrégats cytoplasmiques peut être due à la liaison de ICI à des molécules du récepteur nouvellement synthétisées induisant un mauvais repliement de la protéine tel qu'il a été décrit pour L'anti-œstrogène total RU 58668 (Devin-Leclerc, Meng et al. 1998). Ces agrégats peuvent être également un artefact de la surexpression de la protéine qui sature les systèmes d'import nucléaire. Globalement, nos résultats suggèrent que le phénomène d'insolubilité prend place au sein du noyau.

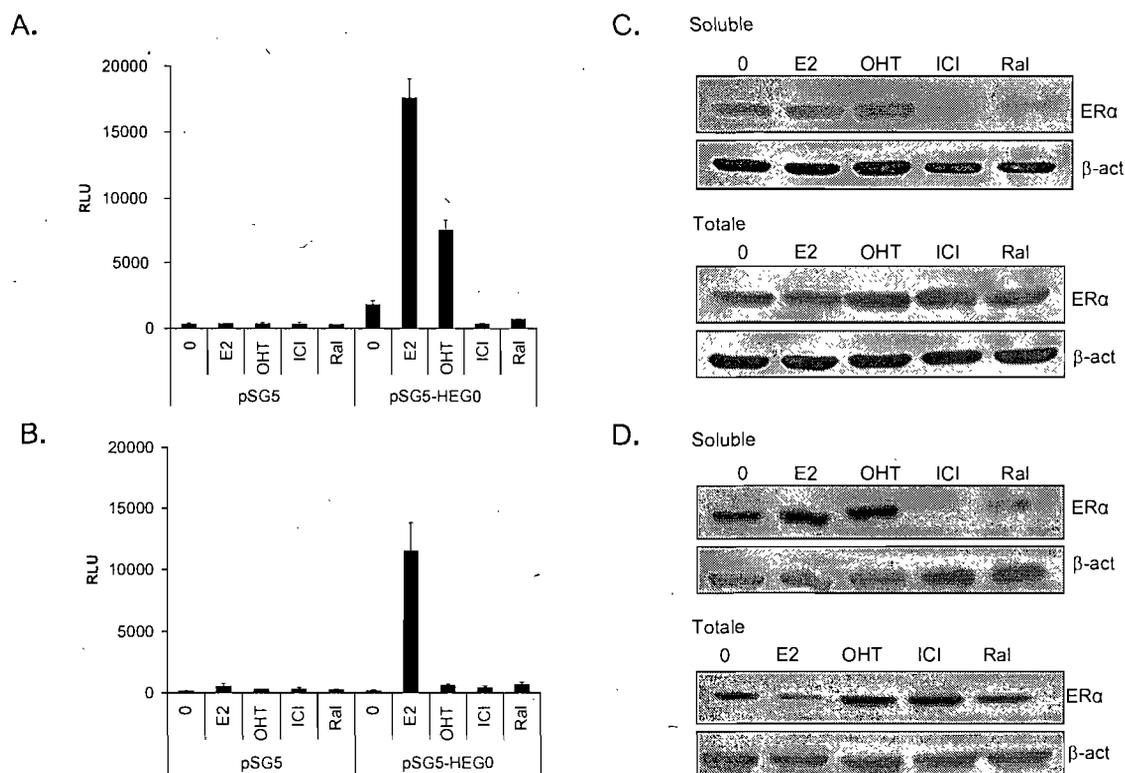


Fig.7. Les anti-oestrogènes totaux suppriment l'activité transcriptionnelle de ER α et sa solubilité dans des tampons d'extraction sans détergent dans les cellules HepG2 et HEK293.

Les cellules ont été transfectées par le vecteur d'expression ER α ou le vecteur vide, le vecteur rapporteur ERE3-TATA-Luc et le contrôle interne β Gal. Les cellules ont été incubées immédiatement avec le solvant ou les ligands (E2 25 nM, OHT 100 nM, ICI182,780 100 nM, Ral, 100 nM). Pour le test de transactivation, les cellules ont été lysées après 48h de transfection avec le tampon luciférase et les niveaux de luminescence ont été normalisés par les niveaux de l'activité β -galactosidase. Les niveaux du récepteur obtenus après traitement des cellules pendant 16 h par le tampon riche en sel HSB (fraction soluble) ou le tampon Laemmli (fraction totale) sont analysés par immunobuvardage de type western.

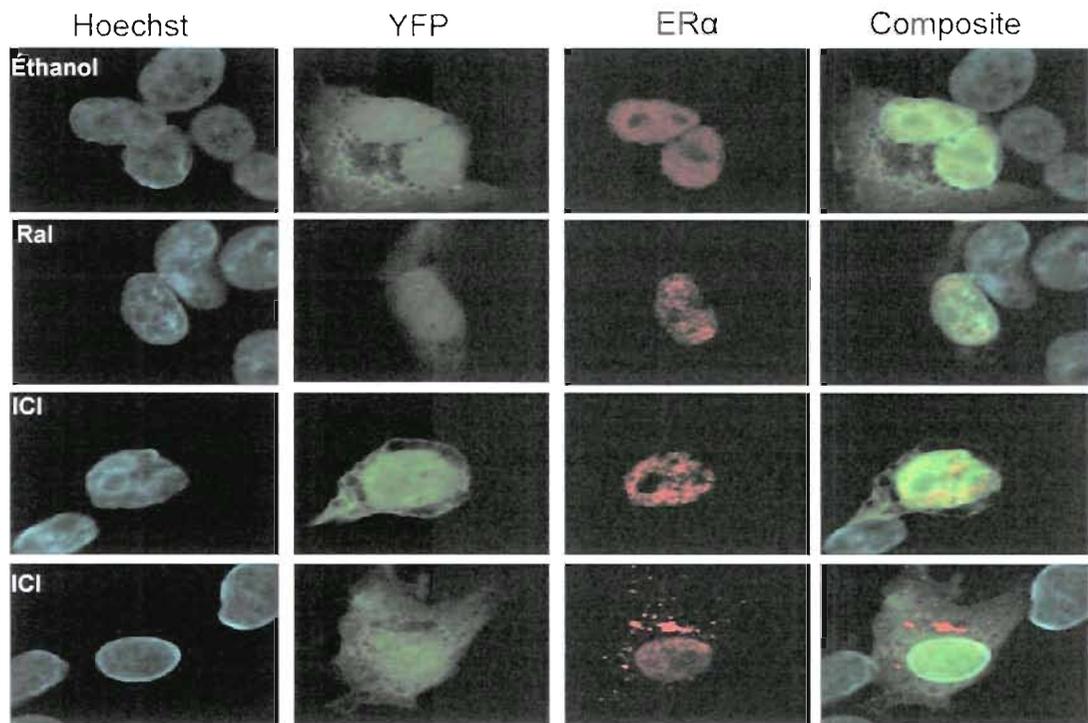


Fig.8. Les anti-oestrogènes totaux n'affectent pas la localisation nucléaire prédominante de ER α .

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les vecteurs d'expression de ER α sauvage et par le vecteur d'expression de la YFP. Après 16h de traitement par le solvant ou les ligands (E2 25 nM, ICI182,780 100 nM, Ral,100 nM), les cellules ont été fixées et perméabilisées. Les marquages ont été réalisés par un anticorps anti-ER α de souris (B-10) et un anticorps secondaire de chèvre Alexa fluor 595. Les noyaux ont été marqués par Hoechst33342. Les lignes 3 et 4 représentent des cellules traitées par ICI, le phénotype de la ligne 3 est le plus prédominant par rapport à celui de la ligne 4. Les images correspondent de gauche à droite au marquage nucléaire à 405 nm, fluorescence de la YFP à 480 nm, marquage de ER α à 595 nm et à une image composite.

2-L'insolubilité du récepteur en présence des anti-oestrogènes totaux est observée dans des cellules qui expriment le récepteur de manière endogène

Pour vérifier si ce phénomène d'insolubilité résulte d'une surexpression du ER α , les expériences décrites ci-dessus ont été reproduites avec des cellules de carcinome mammaire MCF7, qui expriment ER α de manière endogène (**Fig 9**). Dans ces cellules, ICI induit une dégradation rapide du récepteur et cette dégradation de la protéine commence à être observable dès une demi-heure de traitement (**Fig 9B**). Cependant, un phénomène de résistance à l'extraction par les sels comparable à celui observé au niveau des cellules transfectées peut être observé dans les cellules MCF7 après 15 minutes de traitement avec ICI et Ral, avant que la dégradation du récepteur ne soit détectable (**Fig 9A**), tel que décrit précédemment (Giamarchi, Chailleux et al. 2002). Nous avons également vérifié l'effet de l'inhibition de la dégradation sur le phénomène de la résistance à l'extraction par le sel. Après 30 minutes de traitement avec ICI et en absence d'inhibition du protéasome 26 S, le récepteur disparaît à la fois de la fraction soluble et de la fraction totale. Quand la dégradation est inhibée, les niveaux du récepteur diminuent encore fortement par rapport aux autres traitements dans la fraction soluble, mais pas dans la fraction totale. Ces observations suggèrent que le phénomène d'insolubilité du récepteur en présence d'anti-oestrogènes se produit de manière indépendante de la dégradation.

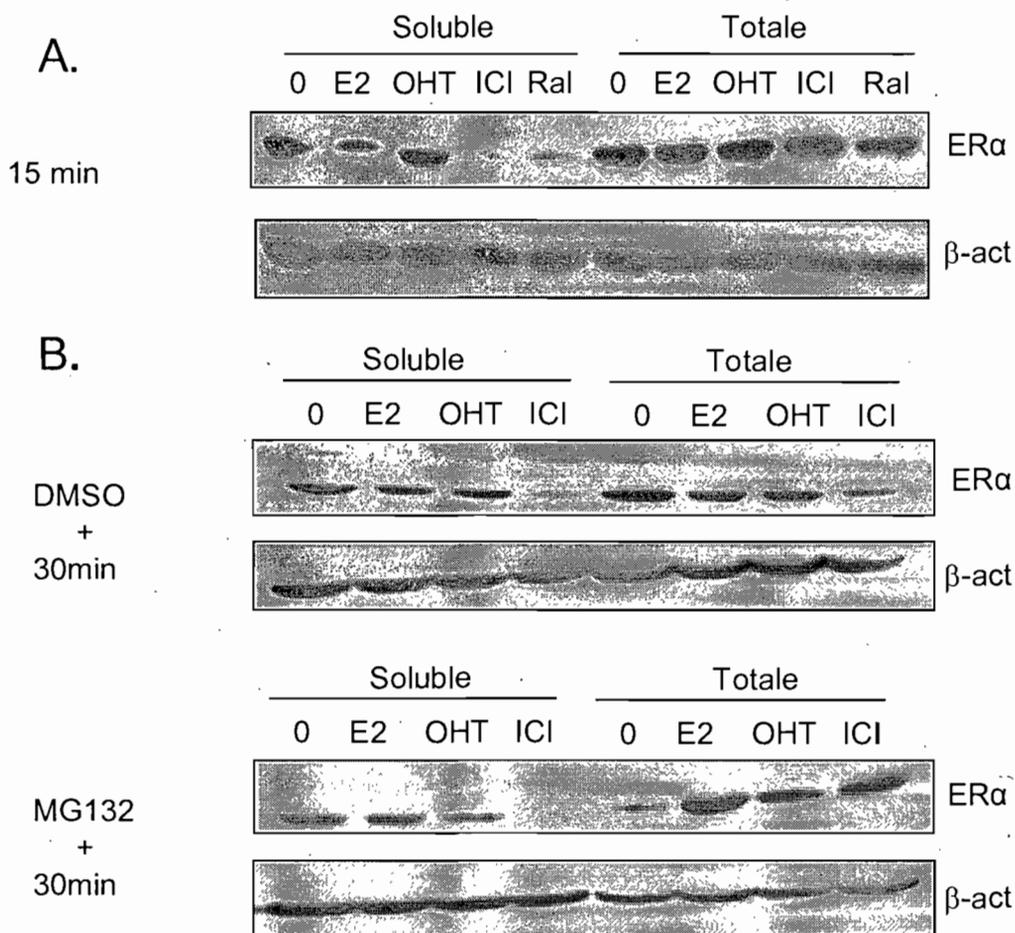


Fig.9. Les anti-oestrogènes totaux affectent la solubilité du récepteur endogène dans les cellules MCF7.

A. Les cellules (ER α +) MCF7 ont été incubées durant 48h dans un milieu blanc contenant du sérum traité. Ensuite, elles ont été traitées durant 15 minutes par le solvant ou les ligands (E2 25 nM, OHT 100 nM, ICI182,780 100 nM, Ral, 100 nM). Les niveaux du récepteur extrait par le tampon HSB (fraction soluble) ou le tampon Laemmli (fraction totale) sont caractérisés par analyse de type western. **B.** Les cellules MCF7 ont été prétraitées par du DMSO ou MG132 durant 16h puis durant 30 minutes avec le solvant ou les ligands. Les niveaux des protéines extraites par le tampon HSB (fraction soluble) ou le tampon Laemmli (fraction totale) ont été analysés par immunobuvardage de type western

3-Rôle de l'hélice H12 dans le phénomène d'insolubilité /répression du récepteur

À la recherche d'une base moléculaire du phénomène d'insolubilité, nous avons réalisé des expériences pour identifier les domaines de ER α qui sont nécessaires à la mise en place d'un tel phénomène (**Fig 10**). La délétion de la région A/B n'influence pas le profil de solubilité en présence de ICI c'est-à-dire une résistance à l'extraction par le sel alors que le récepteur est complètement resolubilisé en présence de Ral ce qui suggère que même ces deux anti-oestrogènes induisent le même phénomène d'insolubilité, les déterminants moléculaires nécessaires dans les deux cas sont différents.

Les effets antagonistes des anti-oestrogènes résultent de leurs chaînes latérales qui empêchent le positionnement de l'hélice H12 par dessus la cavité de liaison du ligand (Brzozowski, Pike et al. 1997; Shiau, Barstad et al. 1998; Pike, Brzozowski et al. 1999). Des études précédentes ont indiqué un rôle de certains résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12 dans l'action antagoniste des anti-oestrogènes. En effet, les doubles mutations L539A-L540A et M543A-L544A ou la mutation simple L540Q inversent les propriétés transcriptionnelles du récepteur dans les cellules transfectées en présence des antioestrogènes (Mahfoudi, Roulet et al. 1995; Norris, Fan et al. 1998). Pour mieux comprendre le rôle des résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12? nous avons effectué une superposition des structures des différents anti-oestrogènes au niveau du domaine de liaison du récepteur ER α dans sa conformation agoniste (**Fig11**).

Les chaînes latérales de OHT, Ral et ICI créent une interférence stérique au niveau de la leucine L540 et potentiellement de la leucine L536. La tyrosine Y537A ne serait elle pas en mesure de participer à des effets déstabilisateurs de la conformation de l'hélice H12. Nous avons examinés aussi l'effet des chaînes latérales de ICI et Ral sur le positionnement de l'hélice H12 au niveau du complexe ER α -OHT (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que l'effet déstabilisateur de la chaîne latérale de Ral sur les résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12 est minimisé. Alors que la chaîne latérale de ICI continue à exercer un effet déstabilisateur direct avec la leucine L536 et à un degré moindre avec L540.

Pour mieux caractériser le rôle des résidus longs hydrophobes de l'hélice H12 dans la répression transcriptionnelle du récepteur en présence de ICI et Ral et dans le phénomène

d'insolubilité dans le tampon HSB, des mutations systématiques des résidus L536, L539 et L540 en alanine ont été réalisées et les profils de transactivation et d'extraction des mutants résultants ont été comparés à ceux du récepteur de type sauvage (**Fig12**). Les trois mutations permettent un regain partiel d'environ 20% de la propriété de transactivation en présence de ICI. En présence de Ral l'effet est plus imposant allant jusqu'à 50% pour les mutants L536A et L539. Par contre le mutant L540A ne présente aucune activité partielle en présence de Ral. Au niveau de la propriété d'extraction, les mutants présentent une stabilité comparable à la protéine de type sauvage au niveau de la fraction totale sauf le mutant L536A qui a tendance à avoir une plus forte expression. Au niveau de la fraction soluble, ces mutants exercent un effet marquant sur la solubilité dans le tampon HSB qui corrèle avec leur profil de transactivation, En effet les mutants qui transactivent partiellement en présence de ICI et Ral ont une solubilité accrue dans le tampon HSB, D'autre part, le mutant L540 qui ne regagne pas de transactivation en présence de Ral n'est pas plus soluble que le récepteur sauvage dans le tampon HSB.

Concernant les profils de distribution cellulaire des mutants de l'hélice H12 (résultats non montrés). À l'instar de la protéine de type sauvage, les mutants présentent une localisation strictement nucléaire en présence de ICI, ils montrent une distribution nucléaire uniforme et aucun phénotype de microagrégats nucléaires ou cytoplasmiques n'a été observé.

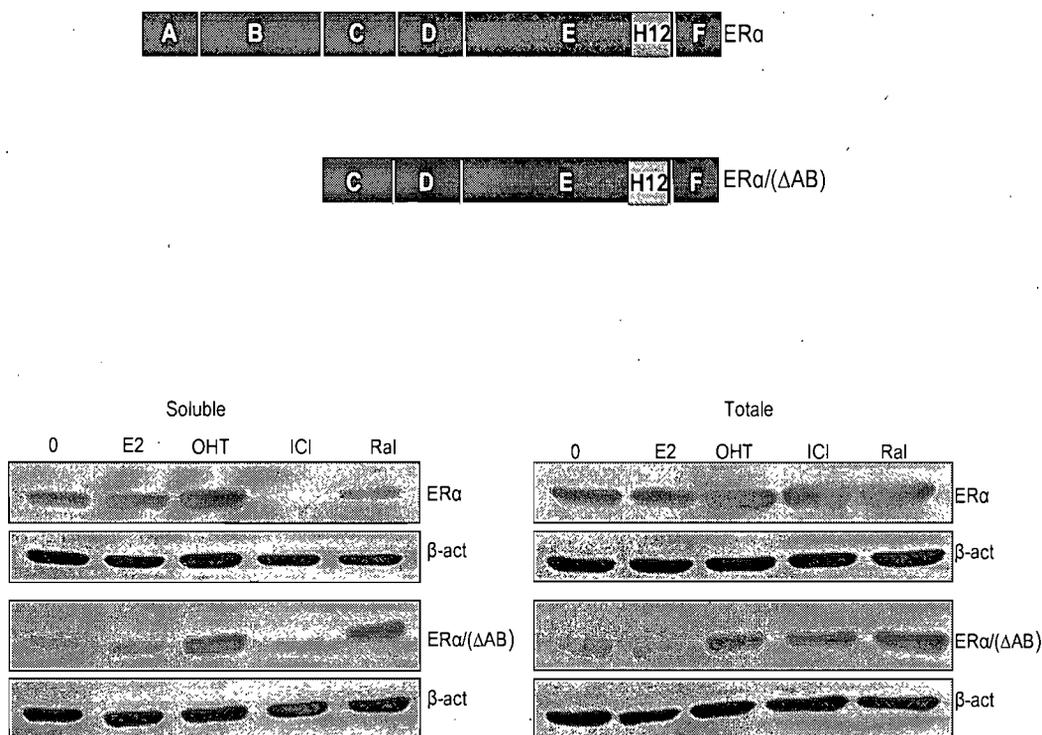


Fig.10. La région A/B n'est pas nécessaire à l'insolubilité en présence de Ral

Les cellules HepG ont été transfectées par le vecteur d'expression ER α ou le vecteur d'expression ER α (Δ AB). Les cellules ont été incubées durant 16h avec le solvant ou les ligands (E2 25 nM, OHT 100 nM, ICI182,780 100 nM, Ral, 100 nM). Après 48h de transfection les niveaux du récepteur obtenus par extraction dans le tampon HSB (fraction soluble) ou le tampon Laemmli (fraction totale) ont été analysés par immunobuvardage de type western

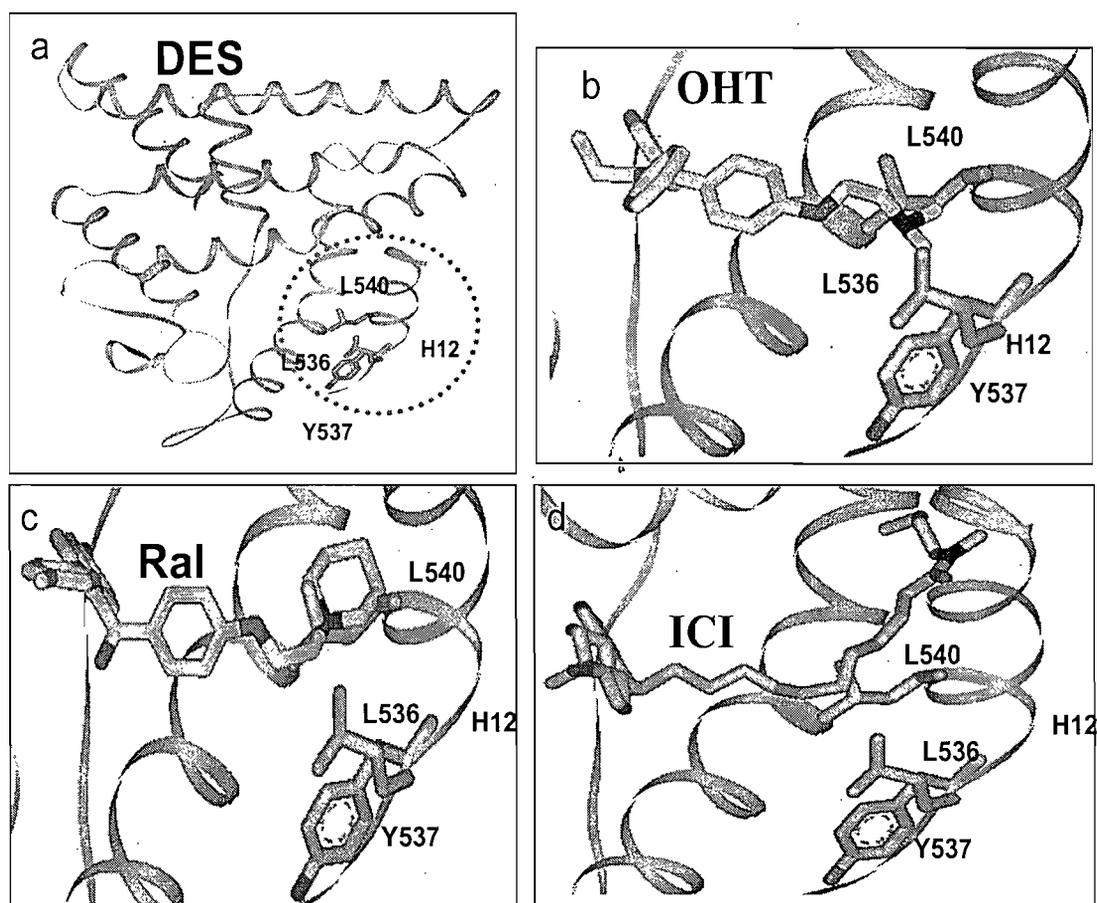


Fig.11. Les contraintes stériques potentielles entre les résidus longs hydrophobes de l'hélice H12 et les chaînes latérales des anti-oestrogènes.

a. Représentation de la structure cristallographique du complexe de conformation agoniste LBD (ER α)-DES. **b, c et d.** Respectivement, superposition de OHT, Ral et ICI à la place de DES dans le complexe agoniste. Les leucines L536 et L540 entraînent des contraintes stériques avec les chaînes latérales des anti-oestrogènes Ral et ICI.

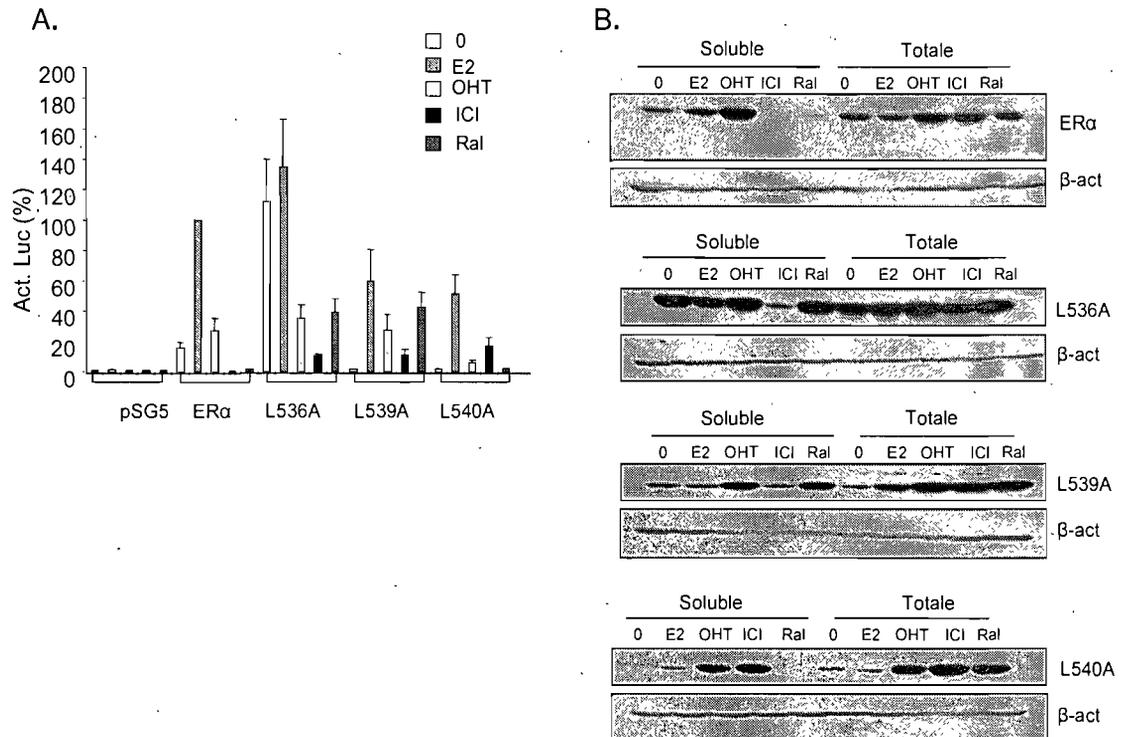


Fig.12. Les mutants de l'hélice H12 de ER α modulent l'effet des anti-oestrogènes sur les propriétés de transactivation et d'extraction du récepteur.

A. Les cellules HepG2 ont été transfectées par le vecteur vide ou les vecteurs d'expression de ER α sauvage ou des mutants de l'hélice H12 et par le vecteur rapporteur ERE3-TATA-Luc et le contrôle interne β Gal. Les cellules ont été incubées durant 16h avec le solvant ou les ligands (E2 25 nM, OHT 100 nM, ICI182,780 100 nM, Ral, 100 nM). Les cellules ont été lysées après 48 h de transfection avec le tampon luciférase et les niveaux de luminescence ont été normalisés par les niveaux d'activité β -galactosidase. **B.** Les cellules HepG2 ont été transfectées par les vecteurs d'expression de ER α sauvage ou des mutants de l'hélice H12 durant 48h. Après 16h de traitement par le solvant ou les ligands, les niveaux de ER α extraits par le tampon HSB (fraction soluble) ou le tampon Laemmli (fraction totale) sont analysés par immunobuvardage de type western.

4-L'insolubilité en présence des anti-oestrogènes totaux corrèle avec une mobilité intra-nucléaire diminuée

L'insolubilité en présence de ICI et Ral étant un phénomène intranucléaire et des études précédentes ayant montré que la mobilité intranucléaire du récepteur est modulée par les ligands (Htun, Holth et al. 1999; Stenoien, Mancini et al. 2000), nous nous sommes demandés si l'effet de ICI et Ral sur la solubilité du récepteur correspond à une association différente avec des composants de la matrice nucléaire. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé un test de dynamique moléculaire basé sur la mesure de la mobilité de molécules fluorescentes, le FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Le principe de cette technique repose sur une propriété intrinsèque des protéines fluorescentes. Quand un laser puissant est dirigé sur une zone donnée, les protéines fluorescentes au sein de cette zone sont inactivées de manière irréversible et cessent d'émettre de la fluorescence. Plus les molécules avoisinantes sont mobiles plus la régénération de la fluorescence au sein de la zone inactivée est rapide.

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les vecteurs d'expression de ER α sauvage ou de mutants de l'hélice H12 fusionnés à la YFP (yellow fluorescent protein). Les protéines de fusion ont été testées pour leur fonctionnalité et leur mobilité en présence de différents ligands (**Fig 13**). Lorsque les cellules sont traitées uniquement avec le solvant, la zone d'inactivation est régénérée en moins de 10 secondes, ce qui témoigne d'une grande mobilité du récepteur. En présence de ICI et de Ral, la zone inactivée demeure visible même après 210 secondes, ce qui indique une mobilité réduite des molécules du récepteur. Les mutants de l'hélice H12 ont un effet marquant sur la mobilité intranucléaire du récepteur. En présence de ICI, les mutants L536A, L539A et L540A permettent de régénérer 60% de la fluorescence en 60 secondes, ce qui suggère une plus grande mobilité. En présence de Ral, les mutants L536A et L539A montrent une grande mobilité. Cependant, le mutant L540A se comporte comme le récepteur de type sauvage; sa mobilité corrèle donc avec son profil d'extraction et de transactivation en présence de Ral (**Fig 12**). Ces résultats suggèrent que l'insolubilité en présence de ICI et Ral corrèle avec une diminution de la mobilité du récepteur au sein du noyau.

Des études précédentes ont montré que le récepteur en présence de ICI interagit avec les cytokératines 8 et 18 (Stenoien, Mancini et al. 2000; Giamarchi, Chailleux et al. 2002; Long and Nephew 2006), qui sont des filaments intermédiaires faisant partie de la matrice nucléaire et ont été décrites comme des protéines insolubles (Smetana and Busch 1963; Berezney and Coffey 1974). La figure 14 montre que le profil d'extraction du ER α en présence de ICI se superpose avec celui des cytokératines 8 et 18, suggérant une interaction du récepteur plus forte avec la matrice nucléaire en présence de ICI et Ral.

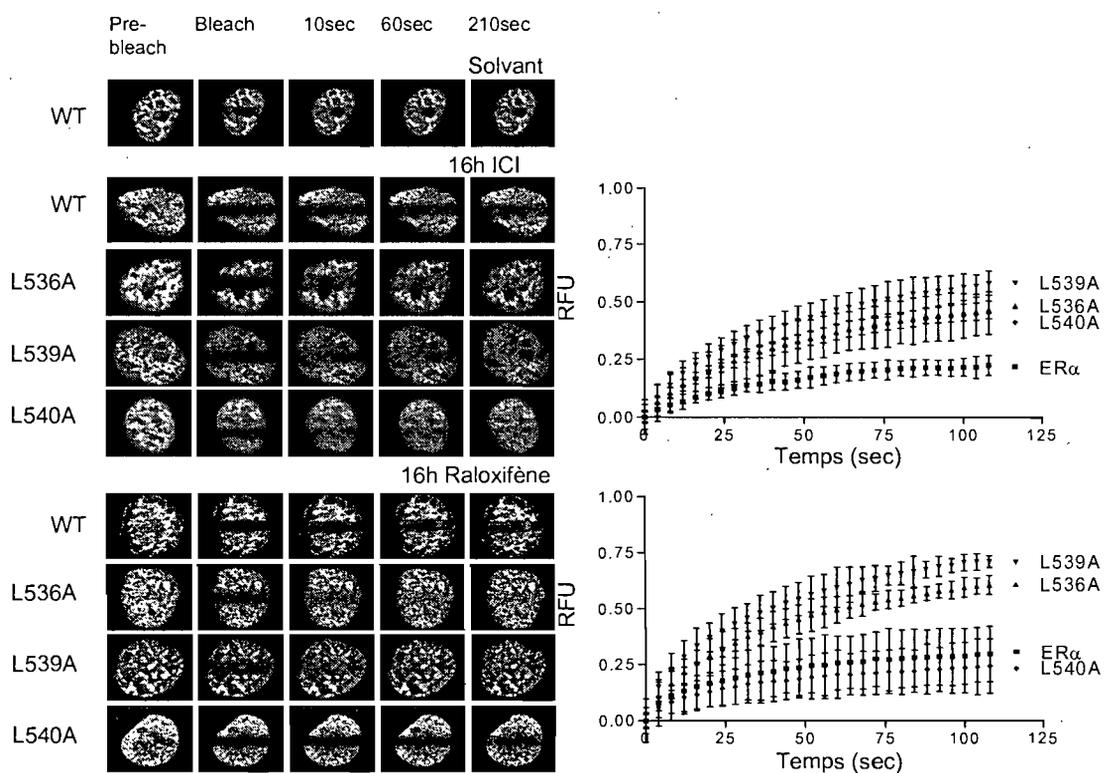


Fig.13. ICI et Ral induisent une immobilisation de ER α mais les mutants de l'hélice H12 augmentent la mobilité intranucléaire en présence d'anti-oestrogènes totaux.

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les vecteurs d'expression de ER α sauvage ou des mutants de l'hélice H12 fusionnés à la YFP et traitées durant 16h par le solvant ou les ligands. La fluorescence d'une zone de taille fixe au sein de chaque noyau a été inhibée par exposition soutenue à un laser Argon 488 nm. Des images ont été capturées toutes les 4 secondes et les niveaux de fluorescence des régions d'intérêt ont été quantifiés et normalisés sur le niveau de fluorescence de la cellule entière. Les barres d'erreurs proviennent de trois mesures indépendantes.

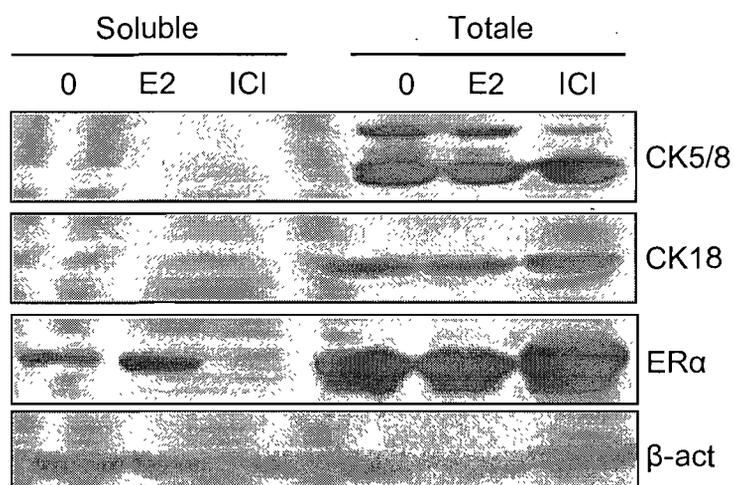


Fig.14. Les composantes de la matrice nucléaire cytokératines 8 et 18 sont insolubles dans le tampon HSB.

Les cellules HepG2 ont été transfectées par les vecteurs d'expression de ER α sauvage durant 48h. Après 16h de traitement avec le solvant ou les ligands, les niveaux de ER α et les cytokératines 5/8 et 18 sont analysés par immunobuvardage de type western.

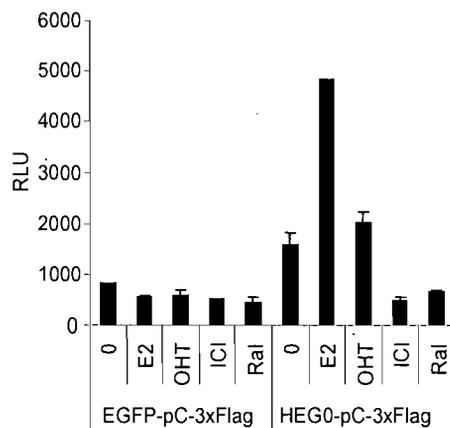
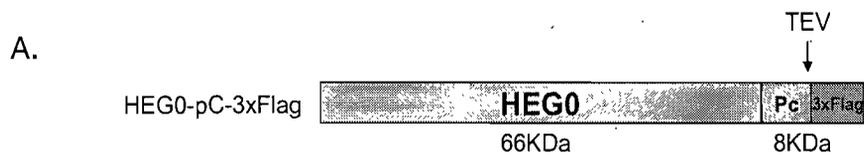
5-L'extraction du ER α en présence des anti-oestrogènes est une étape limitante pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction

L'insolubilité de ER α en présence de ICI et Ral peut impliquer un mécanisme qui utilise une machinerie qui reconnaît spécifiquement la conformation du récepteur en présence de ces deux ligands. Pour identifier de nouveaux partenaires d'interaction, une approche de type TAPTAG a été utilisée, cette approche consiste à combiner deux épitopes de haute affinité pour réaliser deux étapes de purifications successives. ER α a été fusionné du côté carboxy-terminale à la protéine C et à une signature de type 3xFlag, un site de clivage de la protéase TEV a été introduit entre la protéine C et le 3xFlag (**Fig15 A**). Les propriétés de transactivation et d'extraction de la fusion ER α -pC-3xFlag ont été testées. Au niveau des cellules HepG2, la fusion conserve un profil de transactivation semblable à la protéine de type sauvage. Une induction marquée de la transactivation en présence de E2 (**Fig 15B**). OHT conserve une légère activité partielle alors que ICI et Ral se comportent comme des anti-oestrogènes totaux et ramènent les niveaux de transactivation au niveau de ceux observés pour le vecteur vide. Au niveau des cellules HepG2, les propriétés d'extraction de la fusion montrent après 16h de traitement avec ICI que le récepteur est insoluble et qu'il s'extrait au niveau de la fraction totale cependant, en présence de Ral les signatures ajoutées ont tendance à augmenter l'extraction du récepteur comparativement avec le solvant mais la majorité de la protéine est extraite au niveau de la fraction totale. Au niveau des cellules HEK293, après une heure de traitement, on remarque que l'insolubilité avec ICI est perceptible comparativement avec le solvant quoique les signatures ajoutées à la protéine semblent augmenter légèrement sa solubilité. Dans le cas de Ral, ces signatures inversent complètement son profil d'extraction à l'instar des observations faites au niveau des cellules HepG2.

Afin d'identifier de nouveaux partenaires du ER α avec les anti-oestrogènes totaux, Il a fallu identifier les conditions adéquates qui permettent d'extraire le récepteur en présence de ICI et de préserver les interactions protéines protéines.

Nous avons comparé les propriétés d'extraction précoces et tardives de la fusion ER α -pC-3xFlag dans les cellules HepG2 en utilisant deux tampons différents (**Fig.16**). Des observations précédentes au niveau des cellules MCF7 on permis d'identifier les CK8 et

CK18 comme partenaires spécifiques à ER α avec ICI en utilisant un tampon à 1%NP40, 0,5% Triton X-100 (Long and Nephew 2006). Nos expériences préliminaires ont montrés que l'efficacité de ce tampon est améliorée considérablement par l'ajout de 0,5% SDS. Nous avons décidé de comparer un tampon à 1% NP40, le NP40 est un détergent non ionique non dénaturant couramment utilisé dans les tampons qui étudient les fonctions des protéines, et un tampon à 1%NP40, 0,5% Triton X-100 et 0,5% SDS. Après une heure de traitement avec ICI les deux tampons permettent d'extraire des quantités comparables de ER α , une légère insolubilité est observée avec le tampon à 1%NP40 alors qu'après 16h de traitement, ce tampon n'extrait que la moitié de ER α en présence de ICI comparativement au tampon à 1%NP40, 0,5% Triton X-100 et 0,5% SDS. Ces résultats suggèrent qu'il y a une cinétique d'accumulation du récepteur dans une fraction insoluble et que la purification de partenaires d'interaction serait grandement influencée par la nature du tampon et la durée de traitement choisis.



B.

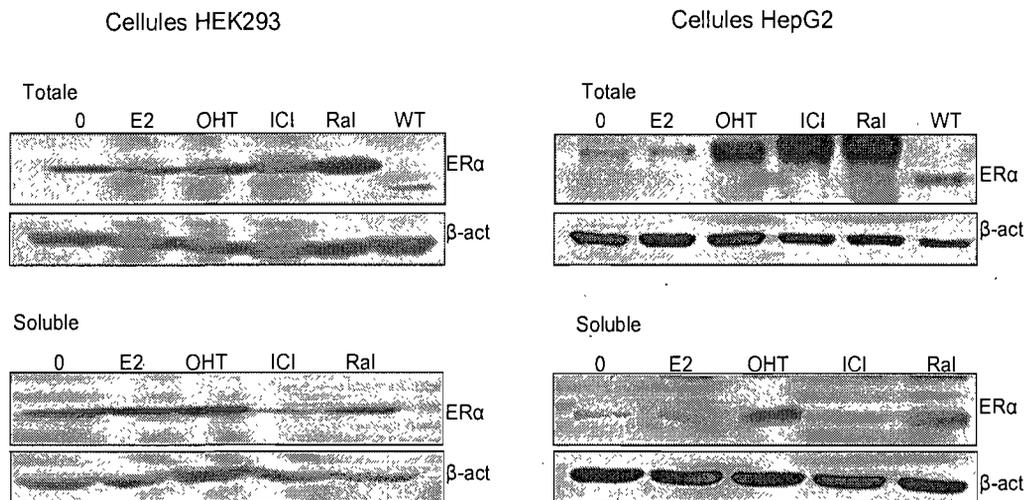


Fig.15. La fusion HEG0-pC-3xFlag est fonctionnelle et préserve les propriétés de transactivation et d'extraction en présence des anti-oestrogènes.

A. Construction de type TAPTAG qui code pour ER α sauvage fusionné à la protéine C, un site de clivage de la protéase TEV et une signature 3xFlag. **B.** Les cellules HepG2 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0-pC-3xFlag ou le vecteur vide et par le vecteur rapporteur ERE3-TATA-Luc et le contrôle interne β Gal. Ensuite, elles ont été incubées durant 16h avec le solvant ou les ligands (E2 25 nM, OHT 100 nM, ICI182,780 100 nM, Ral, 100 nM). Pour le test de transactivation, les cellules ont été lysées, après 48h de transfection, avec le tampon luciférase et les niveaux de luminescence ont été normalisés par le niveau d'activité β -galactosidase. Pour le test d'extraction différentielle, les cellules HepG2 et HEK293 ont été transfectées durant 48h et traitées (16h pour les HepG2 et 1 heure dans le cas des HEK293). Les niveaux du récepteur sont obtenus par le tampon HSB (soluble) ou le tampon Laemmli (Totale) et analysés par immunobuvardage de type western.

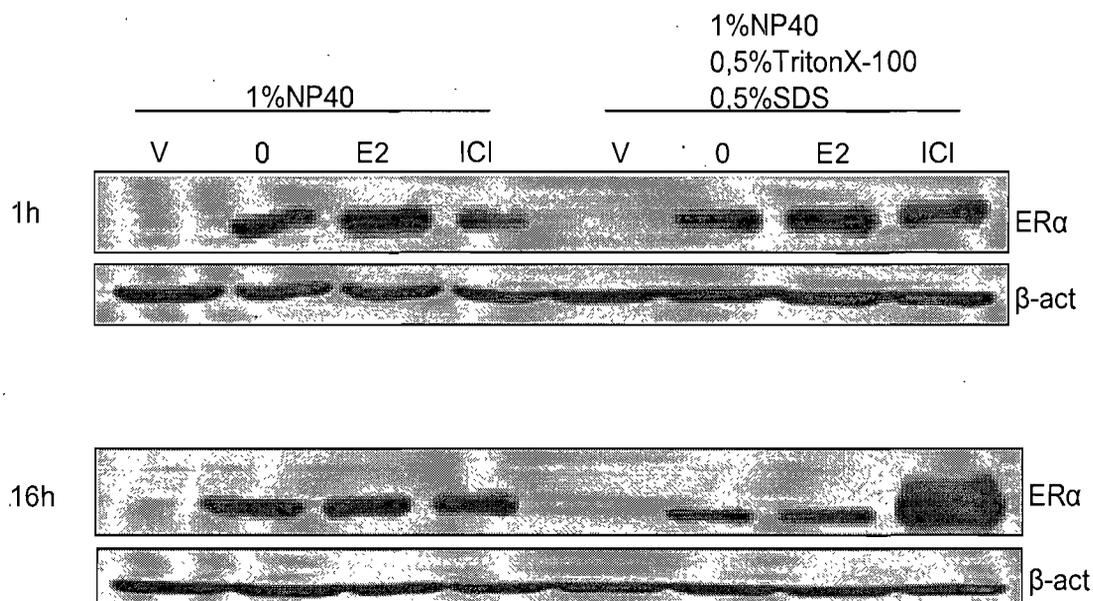


Fig. 16. Le tampon à 1% NP40 permet de solubiliser une partie de ERα en présence de ICI.

Les cellules HepG2 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0-pC-3xFlag ou le vecteur vide durant 48 heures et traitées pendant une heure ou 16 heures avec le solvant ou les ligands. Les cellules ont été lysées par un tampon à 1% NP40 ou un tampon à 1% NP40, 0,5 Triton X-10 et 0,5%SDS. Des quantités égales de protéines ont été déposées et les immunobuvardages correspondent à ERα et β-actine.

6-L'Identification du complexe hACF comme partenaire spécifique à ER α avec ICI

Les expériences de purification de complexes protéiques nécessitent une grande quantité de protéines et vu le pourcentage de transfection des cellules HepG2 qui ne dépasse pas les 25% on a décidé d'utiliser les cellules HEK293. Le pourcentage de transfection de ces cellules atteint des proportions de 80%. Les cellules HEK293 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0-pC-3xFlag ou le vecteur vide durant 48 heures et traitées pendant une heure avec le solvant ou les ligands et la lyse cellulaire a été fait par un tampon à 1% NP40. Les lysats ont été soumis à une immunoprécipitation par un anticorps spécifique à la signature 3xFlag.

Les expériences d'immunoprécipitation (**Fig 17**) ont permis d'identifier des bandes qui correspondent à la fusion ER α -pC-3xFlag (environ 75 KDa) au niveau des pistes 0, E2, ICI, et une bande à 37kDa qui correspond à la EGFP dans la piste V. La piste ICI présente deux bandes 1 et 2 uniques à cette condition. Ces deux bandes ont été excisées et leur contenu en peptides a été analysé par spectroscopie de masse. Après séquençage, une comparaison avec la base de donnée IPI permet d'attribuer les peptides à des protéines déjà connues. Les résultats montrent qu'au sein d'une même bande apparemment homogène d'un poids moléculaire donné, on retrouve des peptides qui appartiennent à plusieurs protéines, dont certaines ont un poids moléculaire différent de celui attendu. Ces derniers peuvent correspondre soit à des protéines fortement associées à une protéine ayant été immunoprécipitée, soit à des protéines très abondantes qui sont des contaminants classiquement retrouvés dans ce type d'approche, incluant par exemple les cytokératines, l'actine et la myosine. Cependant, la présence de peptides retrouvés uniquement en présence d'un ligand particulier est un bon indice de spécificité. La bande 1, correspondant à un poids moléculaire de 180kDa, présente une composante prédominante appelée BAZA1 ou WCRF180. Cette protéine a tel qu'attendu un poids moléculaire de 180 kDa et est fortement représentée (43 peptides). La bande 2, à un poids moléculaire de 130 kDa, contient 34 peptides qui appartiennent à une protéine de 130 kDa appelée SMRACA5 ou SNF2h. Ensemble WCRF180 et SNF2h font partie de complexes de remodelage de la chromatine de type ISWI ayant SNF2h comme sous unité catalytique, incluant les complexes hACF, hCHRAC (Ito, Levenstein et al. 1999). La bande 2 contient aussi 17

peptides qui ont été attribués à une protéine de 115KDa appelée SMARCA1 ou SNF2l, qui est une sous unité catalytique des complexes ISWI de type hNURF mais son appartenance à hACF n'est pas bien établie (Dirscherl and Krebs 2004).

Il existe une grande similitude entre SNF2h et SNF2L, les deux protéines partagent 81% d'identité de séquence et 75% de la séquence de l'ADN codant (Muchardt and Yaniv 1999).

Étant donné cette grande similitude, il est nécessaire de vérifier si les peptides attribués à SNF2l sont des peptides en commun avec SNF2h. La figure 17B montre la spécificité des peptides correspondant à ces deux protéines au sein de la bande 2. Environ 50% de ces peptides peuvent être attribués uniquement à SMARCA5 (SNF2h) et 17% des peptides peuvent être attribués à SMARCA1 (SNF2l) et SMARCA5. Cependant, il existe environ 15% des peptides qui sont uniques à SMARCA1, ce qui suggère la présence de SNF2l dans la bande.

Pour valider l'identité des bandes 1 et 2 identifiées par spectroscopie de masse, une analyse d'immunobuvardage de type western avec des anticorps spécifiques a été réalisée (**Fig 18**). Afin d'améliorer la spécificité de l'analyse, l'épitope 3xFlag a été clivé par la protéase acTEV après immunoprécipitation et le surnageant a été soumis à une étape de purification par une colonne Nickel pour immunoprécipiter de manière sélective la protéase acTEV qui contient une signature polyhistidine.

Les résultats confirment que les composantes du complexe hACF : soient SNF2h et la sous unité non catalytique WCRF180, sont spécifiquement immunoprécipitées avec ER α en présence de ICI. La détection d'une bande qui correspond à SNF2L à 115KDa n'a pas été possible. Cependant, en absence de contrôle positif, la spécificité de l'anticorps reste à vérifier.

Le complexe hNURF contient outre SNF2l et BPTF qui est l'équivalent de WCRF180 au niveau de hACF, deux sous-unités additionnelles qui sont des protéines de liaison à la protéine Rétinoblastome pRb46 et 48. Comme des bandes non spécifiques pourraient masquer des bandes à l'hauteur de 48 et 46 KDa dans le gel coloré à l'argent (**Fig17A**), nous avons vérifié la présence des sous unités pRb48/46 par analyse de type western. Ces deux sous-unités sont exprimées dans les cellules HEK293, mais non retrouvées après

immunoprécipitation de ER α . Ceci suggère que le complexe de type hNURF n'est pas associé au récepteur en présence de ICI, sans écarter la possibilité qu'une fraction du complexe hACF recruté par le récepteur en présence de ICI contienne SNF2l au lieu de SNF2h.

Ce profil d'association diffère de celui des sous-unités catalytiques Brg1/Brm, qui font partie des complexes SWI/SNF caractérisés comme co-activateurs du récepteur en présence de E2. De manière inattendue, nous avons observé que dans nos conditions expérimentales, ces deux sous-unités sont recrutées au même niveau en présence de ICI et de E2.

Lors de l'identification du complexe hACF, nous avons exploité la haute affinité de la signature 3xFlag fusionnée à ER α . Nous avons vérifié la capacité de la protéine sauvage non fusionnée à médier une telle interaction en présence de ICI (**Fig19**). Nous avons utilisé un anticorps contre ER α qui reconnaît la région carboxy-terminale du récepteur et les résultats montrent que l'interaction avec les deux sous unités du complexe persiste de manière spécifique à ICI en absence de la signature pC-3xFlag.

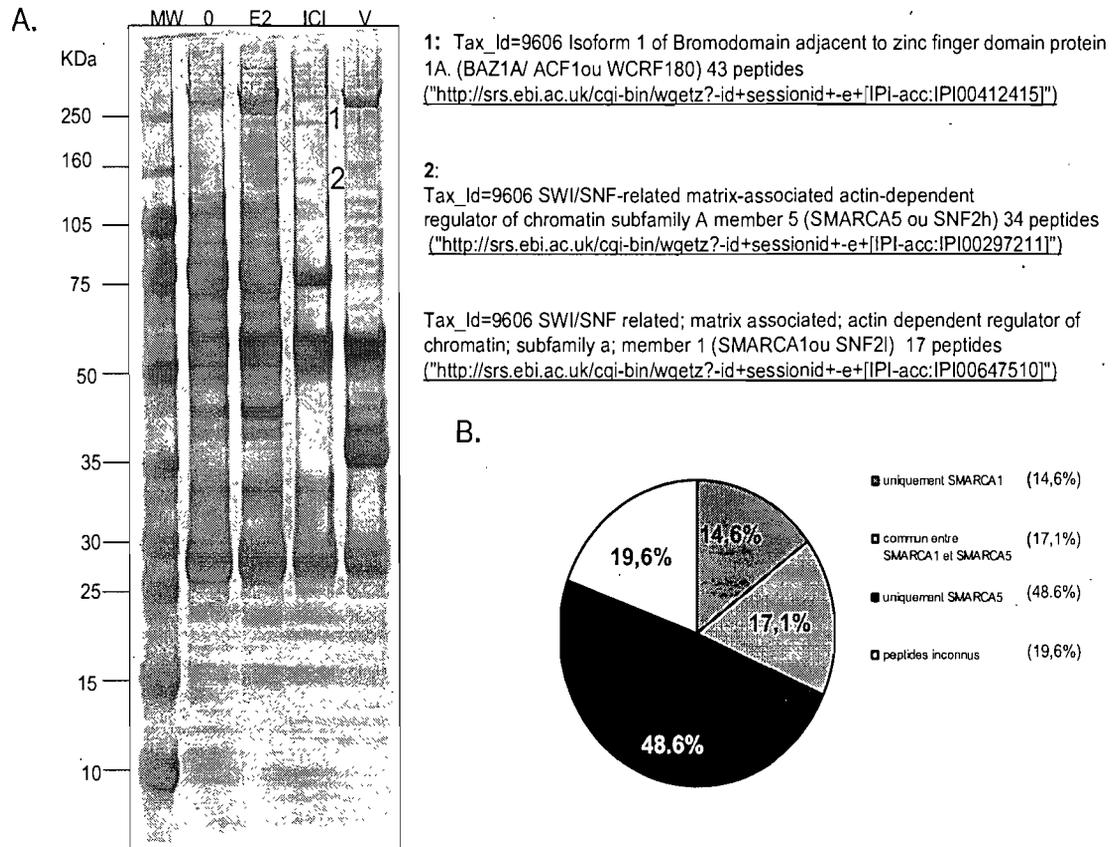


Fig.17. Identification par spectroscopie de masse du complexe hACF : BAZ1A/ACF1/WCRF180 et SMARCA5/SNF2h comme partenaire de ER α en présence de ICI 182,780. **A.** Les cellules HEK293 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0-pC-3xFlag ou le vecteur vide durant 48 heures et traitées pendant une heure avec le solvant ou les ligands. Les cellules ont été lysées par un tampon à 1% NP40. Des quantités égales de protéines ont été soumises à une immunoprécipitation par un anticorps anti Flag M2 de souris couplé de manière covalente aux billes d'agarose. Après les lavages, les protéines ont été éluées des billes par le tampon Laemmli et séparées par SDS-PAGE. Le gel a été coloré par nitrates d'argent et les bandes d'intérêt ont été analysées par spectroscopie de masse. **B.** identité des peptides qui composent la bande 2.

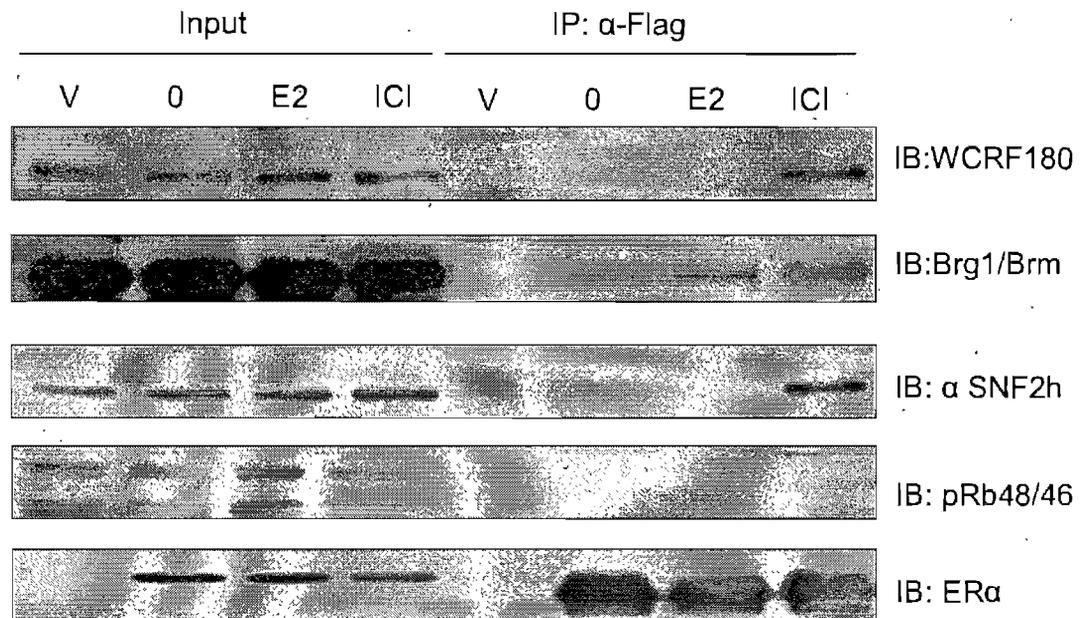


Fig.18. Le complexe hACF est recruté par ER α en présence de ICI 182,780

Les cellules HEK293 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0-pC-3xFlag ou le vecteur vide durant 48 heures et traitées pendant une heure avec le solvant ou les ligands. Les cellules ont été lysées par un tampon à 1% NP40. Des quantités égales de protéines ont été soumises à une immunoprécipitation par un anticorps anti Flag M2 de souris couplé de manière covalente à des billes d'agarose. Après les lavages, un clivage spécifique entre la signature Flag et la protéine C est réalisé par la protéase acTEV. La protéase est immunoprécipitée de manière sélective par des billes couplées au Nickel. Les protéines ont été ensuite concentrées et dosées. Après séparation par SDS PAGE, des immunonuvardages de type western ont été réalisés par les anticorps contre WCRF180, SNF2h, Brg1/Brm, pRb48/46 et ER α .

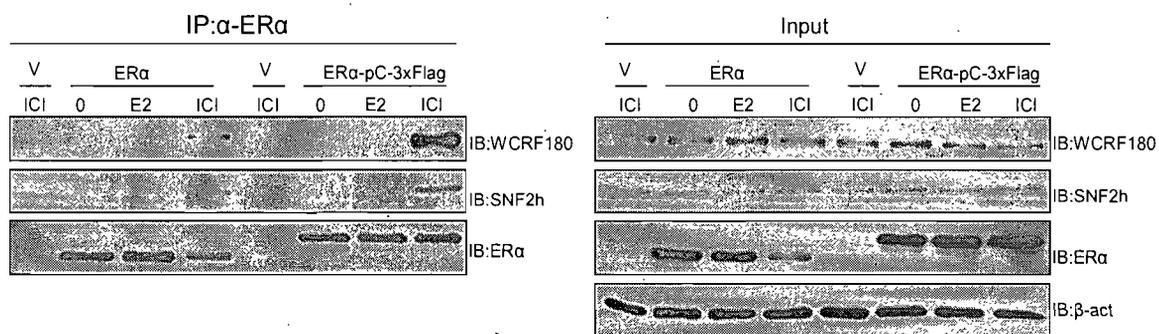


Fig.19. L'interaction avec hACF en présence de ICI n'est pas due la signature carboxy-terminale.

Les cellules HEK293 ont été transfectées par le vecteur d'expression HEG0 ou HEG0-pC-3xFlag ou les vecteurs vides pSG5 ou pEGFP-reel-pC-3xFlag durant 48 heures et traitées pendant une heure avec le solvant ou les ligands. Les cellules ont été lysées par un tampon à 1% NP40. Des quantités égales de protéines ont été soumises à une immunoprécipitation par un anticorps anti ER α (HC20) de lapin. Après les lavages, les protéines ont été éluées des billes par le tampon Laemmli et séparées par un gel SDS-PAGE. Les niveaux de protéines ont été analysés par immunobuvardage à l'aide des anticorps correspondants à ACF1/WCRF180, SNF2h, ER α et β -actine.

7-L'anti-oestrogène total RU58668 et raloxifène ne médient pas l'interaction de ER α avec le complexe hACF

L'identification du complexe hACF comme partenaire de ER α en présence de l'anti-oestrogène ICI, soulève la question de la spécificité de cette l'interaction: envers les différents types d'anti-oestrogènes de type SERMs ou totaux. Des expériences d'immunoprécipitation du récepteur en présence de différents ligands (**Fig 20**) montrent que les sous-unités du complexe hACF sont détectées uniquement en présence de ICI. Ni l'antioestrogène total, RU58668, ni les antioestrogènes de type SERM tels que Ral et OHT ne conduisent à un tel recrutement.

Afin de déterminer le rôle potentiel de l'interaction avec hACF dans les propriétés d'insolubilité et de répression transcriptionnelle induites par ICI, nous avons examiné l'effet des mutations de l'hélice H12 qui conduisent à une solubilité accrue sur l'interaction entre ER α et le complexe hACF, Contrairement au récepteur de type sauvage, le mutant L539A, qui présente une grande mobilité nucléaire et un regain de solubilité et de transactivation en présence de ICI, n'interagit pas avec le complexe hACF. Ces résultats suggèrent que le recrutement de hACF est un mécanisme d'action spécifique à ICI et que cette interaction pourrait jouer un rôle dans l'insolubilité et/ou la répression transcriptionnelle. Par contre, d'autres mécanismes entrent probablement en jeu dans l'insolubilité et la répression transcriptionnelle induites par Ral.

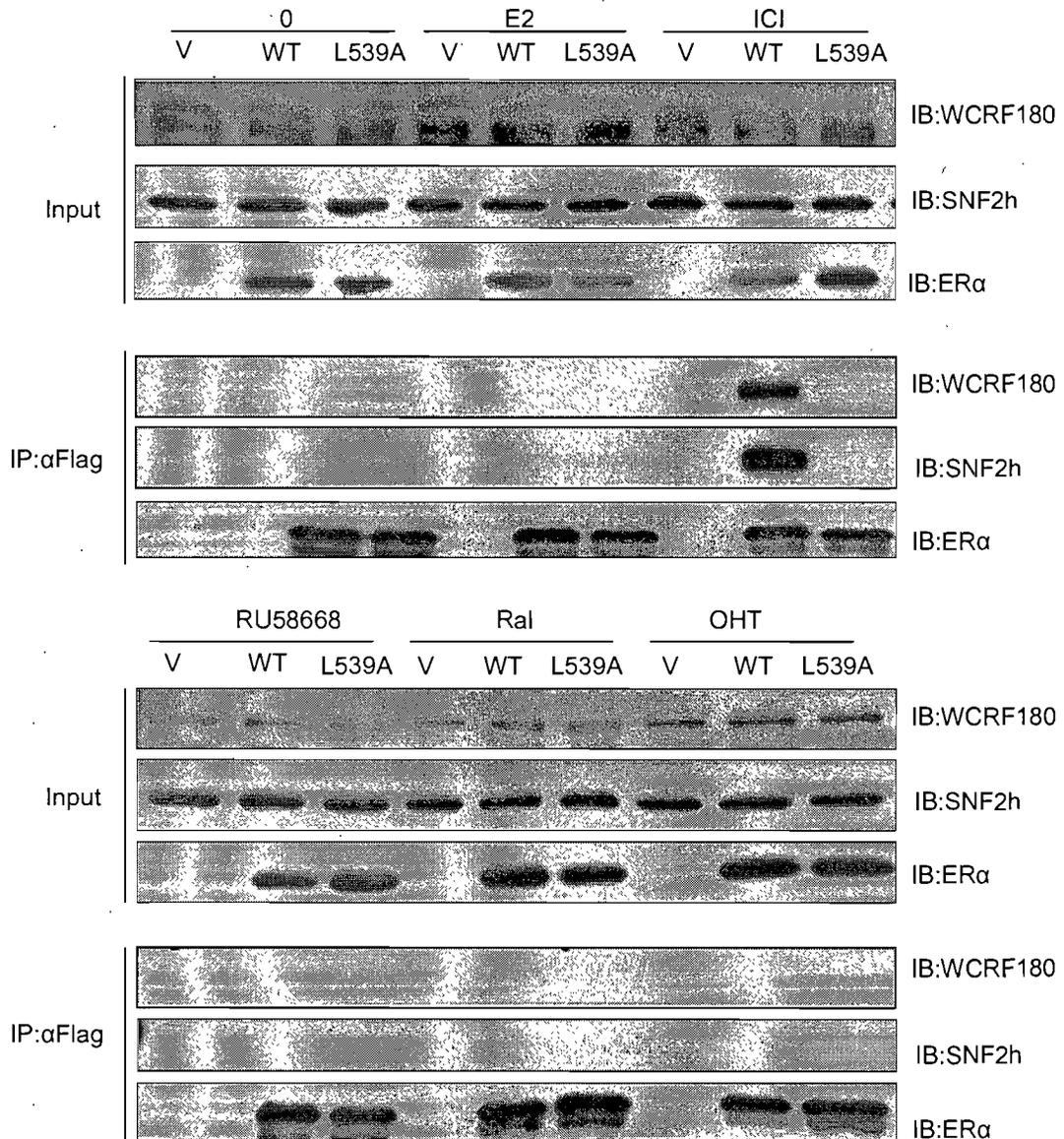


Fig.20. L'interaction hACF et ERα est spécifique à ICI 182,780 et est abolie par le mutant de l'hélice H12 (L539A). Les cellules HEK293 ont été transfectées par les vecteurs d'expression HEG0-pC-3xFlag ou HEG0 (L539A)-pC-3xFlag ou le vecteur vide durant 48 heures et traitées pendant une heure avec le solvant ou les différents ligands. Les cellules ont été lysées par un tampon contenant 1% NP40. Des quantités égales de protéines ont été soumises à une immunoprécipitation par un anticorps anti Flag M2 de souris couplé de manière covalente aux billes d'agarose. Après les lavages, les protéines ont été éluées des billes par le tampon Laemmli et séparées par SDS-PAGE. Des immunonuvardages de type western ont été réalisés avec les anticorps contre ACF1/WCRF180, SNF2h et ERα.

Discussion

Mécanismes d'action des anti-oestrogènes dans les cellules tumorales mammaires

Le but de cette étude était d'analyser les bases moléculaires des mécanismes d'action des anti-oestrogènes totaux. Notre approche utilise à la fois des lignées cellulaires qui expriment ER α de manière endogène et des lignées négatives pour l'expression du récepteur. Ces dernières procurent l'avantage d'introduire individuellement différentes formes du récepteur et d'étudier leur comportement en présence des ligands. Les résultats des essais de transactivation sur un vecteur rapporteur montrent que l'introduction de ER α dans les cellules HepG2 et HEK293 résulte en une activation de la transactivation en présence de E2, le ligand naturel du récepteur, ce qui veut dire que même si ces cellules sont ER-, elles disposent de la machinerie nécessaire pour étudier les propriétés transcriptionnelles du récepteur. Cependant OHT est un anti-oestrogène total au niveau de cellules HEK293 alors qu'il exerce un effet agoniste partiel au niveau des cellules HepG2. Ceci est attribuable aux différences de profil d'expression des co-activateurs de la famille p160/SRC1 entre les deux lignées et au fait que les HepG2 présentent une activité du domaine AF-1 plus grande (Berry, Metzger et al. 1990; Metivier, Penot et al. 2001; Merot, Metivier et al. 2004). Ral et ICI se comportent de la même manière, ils répriment la transactivation agissant comme des anti-oestrogènes totaux même s'ils sont de structure et de mode d'action différents.

La répression exercée par ICI et Ral peut être attribuée à une dégradation de la protéine ou à une incapacité du récepteur complexé à ces ligands à induire la transcription.

Les structures cristallographique de ER α en présence de ICI et Ral suggèrent une conformation du LBD qui limite le recrutement de co-activateurs de la famille p160/SRC1 par la fonction AF-2 (Brzozowski, Pike et al. 1997; Pike, Brzozowski et al. 1999). D'autres observations ont montré que ICI et Ral augmentent le recrutement des complexes corépresseurs N-COR et SMRT. Ces complexes sont associés aux enzymes de type HDAC qui désacétylent les histones favorisant ainsi une structure chromatinienne réfractaire à l'activation de la transcription (Lavinsky, Jepsen et al. 1998; Webb, Nguyen et al. 2003).

La caractérisation de la relation structure-fonction des anti-oestrogènes à relever un paradoxe: de point de vue structurale, OHT et Ral induisent des conformations semblables du LBD mais Ral se comporte comme un anti-oestrogène total. D'autres part, Ral se comporte comme ICI en terme de répression de la transactivation mais n'induit pas une dégradation du récepteur dans les cellules de carcinomes mammaires MCF7 et dans le tissu utérin.

Nos résultats indiquent que les anti-oestrogènes agissent sur les propriétés d'extraction du récepteur. Dans les cellules HepG2 et HEK293, ICI n'induit pas une dégradation du récepteur mais qu'il a un effet sur les propriétés d'extraction du récepteur. Un tampon riche en sel (HSB) ne permet pas d'extraire le récepteur en présence de ICI et à un degré moindre en présence Ral. Cette résistance à l'extraction est corrélée avec les niveaux de transactivation en présence de ces ligands. L'absence du récepteur au niveau de la fraction soluble ne signifie pas une dégradation par le proteasome 26S puisque la protéine est détectée au même niveau qu'avec le solvant dans les extraits totaux. Ces observations ne sont pas spécifiques aux cellules HepG2, elle s'appliquent aussi aux cellules HEK 293 et aux cellules MDA MB231 transfectées de manière stable (Lupien, Jeyakumar et al. 2007). Dans un contexte endogène, le traitement des cellules MCF7 par ICI induit une dégradation rapide du récepteur (Giamarchi, Chailleux et al. 2002) (Wijayaratne and McDonnell 2001). Cependant, des incubations courtes avec ICI et Ral montrent une insolubilité précoce et d'autre part, l'inhibition de la dégradation avec MG132 permet de retrouver le récepteur uniquement dans la fraction totale.

Ces observations prises dans leur ensemble suggèrent que : l'insolubilité dans le tampon HSB se produit dans un contexte endogène et n'est pas attribuable à une surexpression non physiologique de ER α et que l'action de ICI sur le récepteur englobe une composante d'insolubilité précoce qui précède la composante de dégradation.

Mécanismes de la résistance à l'extraction de ER α en présence d'anti-oestrogènes totaux

L'insolubilité en présence de ICI et Ral peut résulter d'un changement au niveau des propriétés d'extraction de la protéine qui ne permettent pas au tampon HSB de la maintenir en solution lors de l'étape de centrifugation. Une cause possible peut être la formation d'un complexe protéique qui sédimente avec le matériel insoluble dans ce tampon.

En accord avec les données structurales, la réduction de la taille des résidus longs et hydrophobes de l'hélice H12 influence clairement les propriétés d'extraction et de transactivation du récepteur. Les mutants L536A et L539A induisent une hausse des niveaux de solubilité et de transactivation du récepteur en présence de ICI et Ral. Par contre le mutant L540A discrimine entre les deux anti-oestrogènes et préserve les propriétés de la protéine de type sauvage en présence de Ral. La structure de l'hélice H12 n'a pas été résolue dans le complexe ER α -ICI, traduisant peut-être un effet déstabilisateur sur la protéine à cause de l'exposition de la cavité de liaison du ligand au solvant (Pike, Brzozowski et al. 1999). Dans le cas de Ral, l'hélice H12 adopte une conformation antagoniste qui empêche le recrutement des coactivateurs. Il semble que les mutants de l'hélice H12 diminuent l'effet déstabilisateur exercé par les chaînes latérales des antioestrogènes et corrigent le repliement de l'hélice H12 par-dessus de la cavité du LBD. Cette conformation pourrait mimer la conformation agoniste et conférer une activité et une solubilité accrues. Par contre, le conflit stérique avec L540 ne peut être résolu dans le cas de Ral par remplacement de cet acide aminé par une alanine.

L'observation des profils de solubilité dans le tampon HSB suggère que l'insolubilité avec ICI et Ral ne nécessite pas les mêmes déterminants moléculaires. Avec Ral, ER α est moins insoluble par rapport ICI et la région A/B joue un rôle important tandis que ICI ne nécessite pas la région A/B pour induire l'insolubilité. Les fonctions de liaison à l'ADN et de liaison du ligand peuvent être impliquées dans ce processus.

La présence de ER α au niveau des séquences ERE des gènes cibles des oestrogènes n'a pas été observée *in vivo* en présence de ICI, probablement dû à la dégradation rapide du récepteur. La caractérisation de profils d'expression génique de cellules MCF7 traitées avec oestrogènes ou anti-oestrogènes a révélé seulement un petit groupe de gènes régulés par

ICI, mais il reste peu clair si cette régulation implique la fixation à l'ADN du récepteur. Cependant, dans les cellules MDA MB231 qui expriment ER α de manière stable, la digestion par la DNase I permet d'extraire une partie du récepteur en présence de ICI (Reid, Hubner et al. 2003). Nos observations vont dans le même sens parce que les expériences d'immunofluorescence indiquent une localisation nucléaire du récepteur en présence de ICI, et que l'ADN fait partie du matériel insoluble dans nos conditions d'extraction dans un tampon riche en sel, au même titre que ER α lié par ICI et Ral. Des expériences futures avec des mutants du ER α qui ne lient pas l'ADN seront utiles pour mieux expliquer le rôle de la liaison à l'ADN dans la mise en place de l'insolubilité.

Des études précédentes ont montré que les anti-oestrogènes totaux induisent la formation d'aggrégats périnucléaires insolubles dans 0,2% de Triton au niveau des cellules COS (Lipfert, Fisher et al. 2006). Ces aggrégats seraient le résultat d'un déficit d'import nucléaire à cause de la liaison de ICI aux récepteurs nouvellement synthétisés au cytoplasme. (Dauvois, White et al. 1993) (Devin-Leclerc, Meng et al. 1998). De manière générale, les protéines mal repliées ont tendance à former des aggrégats (Kawaguchi, Kovacs et al. 2003). Nos expériences d'immunofluorescence ont montré une faible incidence de microaggrégats dans les cellules HepG2 qui expriment transitoirement le récepteur, ce qui concorde avec des observations faites au niveau des cellules HeLa (Stenoien, Patel et al. 2001). Nos résultats suggèrent donc que l'insolubilité se produit au sein d'un compartiment nucléaire et qu'elle n'est pas attribuée uniquement au phénotype de microaggrégats. Cependant, il serait utile de tester l'effet des mutants de ER α qui ne contiennent pas un signal de localisation nucléaire pour vérifier l'incidence d'une insolubilité cytoplasmique.

Les expériences de FRAP donnent des renseignements sur la mobilité de ER α dans le contexte de la cellule vivante sans artefact d'extraction. Le traitement des cellules avec ICI et Ral changent les paramètres de mobilité de ER α en augmentant le temps nécessaire pour régénérer la fluorescence ce qui suggère une immobilisation sur des structures nucléaires. Des résultats précédents ont montré que l'immobilisation de ER α avec ICI va dans le même sens que son accumulation au sein d'une fraction de la matrice nucléaire (Htun, Holth et al. 1999; Stenoien, Mancini et al. 2000; Stenoien, Patel et al. 2001). La matrice nucléaire est la structure résiduelle qui reste insoluble après le traitement des noyaux par la DNase I et

l'éluion avec 2 M de NaCl (Smetana and Busch 1963; Berezney and Coffey 1974; Reid, Hubner et al. 2003). Dans nos conditions d'extraction qui utilisent 0,4 M KCl, cette structure est insoluble. En particulier, les CK8 et CK18 qui font partie de la matrice nucléaire ont été identifiés comme partenaires spécifiques de ER α avec ICI et sont insolubles dans nos conditions de sel du même titre que ER α en présence de ICI (Coutts, Davie et al. 1996; Spencer, Coutts et al. 1998; Long and Nephew 2006).

Les mutants de l'hélice H12 présentent une mobilité intranucléaire accrue en présence de ICI et Ral. D'une part ces mutants confirment le rôle de l'hélice H12 dans l'immobilisation de ER α avec ICI et Ral (Stenoien, Patel et al. 2001). D'autre part, ils suggèrent un lien entre le phénomène de transactivation et de mobilité intranucléaire.

Rôle du complexe hACF dans les effets anti-oestrogéniques de ICI182, 780

À la recherche de composantes nucléaires responsables de l'insolubilité, nous avons identifié le complexe hACF: (ACF1/SNF2h) ou (WCRF180/SNF2h) comme partenaire spécifique de ER α en présence de ICI. Des peptides de SNF2l ont été identifiés également. L'existence d'une telle sous unité dans le complexe hACF n'est pas très bien établie. Il a été suggéré qu'une faible proportion des complexes hACF ou hCHRAC peuvent contenir SNF2l au lieu de SNF2h et l'immunoréactivité qui correspond à SNF2h et SNF2l a été mentionnée au niveau du complexe hWICH contenant la sous unité WSTF très similaire à la sous unité WCRF180 (Bochar, Savard et al. 2000; Bozhenok, Wade et al. 2002; Barak, Lazzaro et al. 2003). Nous avons testé un seul anticorps contre SNF2l et nous étions incapables de confirmer l'existence d'une telle sous unité par immunobuvardage. Il est cependant intéressant de valider si le complexe hACF mis en place en présence de ICI contient une sous unité SNF2l sachant que le complexe hNURF est le seul complexe humain qui contient exclusivement une telle sous unité en plus des sous unités BPTF et Rb46/48(Barak, Lazzaro et al. 2003). D'autres part, SNF2h et SNF2l font partie d'au moins 6 complexes de type ISWI, il est nécessaire de vérifier si d'autres complexes de ce type sont recrutés spécifiquement par les anti-oestrogènes totaux.

Le mutant L539A abolit complètement l'interaction avec WCRF180 (ACF1) et SNF2h en présence de ICI. Il revêt un caractère important car il permet de relier une augmentation de la mobilité nucléaire, la solubilité et la transactivation à la perte de l'interaction avec ce complexe. Il sera intéressant dans le futur de tester les effets des mutations L536A et L540A sur cette interaction, pour déterminer si cette corrélation est renforcée.

Ral induit l'insolubilité au même titre que ICI sans qu'une interaction avec le complexe ne soit observée. Ceci suggère deux possibilités: 1- hACF serait un partenaire dont le rôle n'est pas l'insolubilité ou 2- l'absence de cette interaction est attribuable à des mécanismes d'insolubilité différents entre ICI et Ral. Pour confirmer le rôle du complexe dans l'immobilisation du récepteur, il serait utile vérifier si les profils de mobilité de hACF et ER α se superposent en présence de ICI et l'effet de la déplétion de hACF sur les profils de solubilité, mobilité et de transactivation du récepteur.

L'anti-oestrogène total RU58668 est un analogue du 17 β -estradiol comme ICI mais diffère de ce dernier par l'emplacement de la chaîne latérale située sur le carbone numéro 11. Cet anti-oestrogène n'induit pas une interaction de ER α avec le complexe hACF. Ceci suggère un rôle important de l'emplacement de la chaîne latérale de ICI dans la conformation qui médie l'interaction avec le complexe hACF.

Le complexe hACF recruté en présence de ICI peut jouer un rôle dans la répression. Il a été observé précédemment que WSTF dans le cadre du complexe de remodelage de la chromatine WINAC, interagit directement et de manière ligand indépendante avec le récepteur de la vitamine D3 (VDR) et stabilise sa liaison à l'ADN. WSTF joue un rôle dans de la mise en place d'un complexe co-répresseur formé par N-CoR-SMRT-HDAC au niveau du promoteur du gène qui code pour 1 α -hydroxylase de la vitamine D3 (Kitagawa, Fujiki et al. 2003; Fujiki, Kim et al. 2005; Jeyakumar, Liu et al. 2007).

Le complexe hACF est recruté également par VDR de manière indirecte par l'intermédiaire du complexe co-répresseur N-CoR-HDAC pour maintenir la répression exercée sur les gènes IGFBP3 et RANKL (Ewing, Attner et al. 2007). Dans ce contexte le recrutement de SNF2h n'était cependant pas affecté par des siRNAs dirigés contre ACF1.

Il n'est pas clair si le recrutement de ACF1 et SNF2h par le récepteur des oestrogènes est aussi médié par N-CoR-HDAC, un complexe qui a été décrit comme étant un partenaire de

ce récepteur en présence des anti-oestrogènes. Des expériences de siRNAs dirigés contre N-CoR ou contre ACF1 permettraient de déterminer si ceci est le cas et de déterminer quelle est la sous unité qui interagit directement avec ER α .

Dans un context transcriptionnel, il serait également utile de tester si un traitement par ICI permet la titration du complexe hACF et de lever la répression qu'il exerce sur ses gènes cibles.

D'autres part, dans le cas du récepteur à l'hormone thyroïdienne (TR), il a été démontré que le recrutement de la sous unité SNF2h aux histones par le complexe TR-NCoR-HDAC3 est inhibé par une augmentation de l'acétylation de ces histones (Alenghat, Yu et al. 2006). Dans leur ensemble ces observations suggèrent un rôle de la désacétylation des histones dans le recrutement du hACF au niveaux des voies de signalisation des récepteurs nucléaires, il serait utile de tester l'effet de l'inhibition de l'activité des enzymes HDAC par des inhibiteurs comme TSA sur l'interaction entre ER α et le complexe hACF en présence de ICI.

Le complexe hACF comme composante d'une machinerie d'insolubilité

SATB1 (special AT-rich binding protein) est une composante de la matrice nucléaire qui joue un rôle dans la formation des structures de chromatine d'ordre supérieure. Elle constitue un ancrage pour les boucles de chromatine au niveau de la matrice nucléaire où elle permet de recruter le complexe hACF et les enzymes HDAC1 et 2 pour réprimer le gène *IL2* au niveau des thymocytes (Yasui, Miyano et al. 2002).

Bien qu'il soit plausible que hACF contribue de manière ligand dépendante à l'effet anti-oestrogénique de ICI, il reste à déterminer si ce complexe contribue à l'insolubilité du récepteur, L'interaction de hACF avec SATB1, est compatible avec cette hypothèse. Des expériences d'inhibition d'expression de ces protéines par des siRNAs pourront déterminer leur effet sur la solubilité de ER α en présence de ICI.

Il reste possible que le complexe hACF identifié ne soit qu'une composante du phénomène de l'insolubilité. Nous avons utilisé des conditions d'extractions plus stringentes. Avec le tampon à 1% NP40, 0,5 Triton X-100 et 0,5% SDS. Dans ces conditions nous étions capables d'extraire plus de récepteur en présence de ICI. Ce qui suggère que l'identification

de nouveaux partenaires impliqués dans le phénomène d'insolubilité est limitée par l'étape d'extraction. L'utilisation d'une deuxième étape de purification TAPTAG et une approche de modification covalente (cross-link) pour préserver les complexes permettraient de mieux caractériser d'autres partenaires en présence de ICI.

Conclusions

Nos résultats montrent que l'action des anti-oestrogènes totaux comprend une composante de résistance de ER α à l'extraction en absence de détergents. Cette insolubilité est corrélée avec la répression transcriptionnelle de ER α et avec la diminution de sa mobilité intranucléaire. Malgré leur comportement semblable au niveau des tests de transactivation, de solubilité et de mobilité, ICI et Ral ne mettent pas en jeu les mêmes mécanismes d'insolubilité.

Nous avons caractérisé le rôle des acides aminés longs et hydrophobes de l'hélice H12 du LBD dans l'immobilisation intranucléaire du récepteur en présence de ICI et Ral et avons identifié des mutants de cette hélice qui inversent partiellement le phénomène d'insolubilité, augmentent la mobilité et la transactivation en présences des anti-oestrogènes totaux.

La recherche des mécanismes de l'insolubilité induite par les anti-oestrogènes totaux a permis d'identifier le complexe hACF comme un partenaire spécifique de ER α avec ICI et d'observer un effet marquant du mutant soluble de l'hélice H12 L539A qui abolit complètement l'interaction avec ce complexe. Ces résultats suggèrent une corrélation entre l'insolubilité comme mécanisme d'action des anti-oestrogènes totaux et les facteurs de remodelage de la chromatine ATP dépendant de type ISWI.

Élucider le rôle physiologique de l'interaction entre ER α et hACF améliorera notre compréhension de l'efficacité du traitement des carcinomes mammaire ER+ par Fulvestrant (ICI182, 780) et l'absence de résistance croisée avec le tamoxifène.

Bibliographie

- Aalfs, J. D. and R. E. Kingston (2000). "What does 'chromatin remodeling' mean?" Trends Biochem Sci **25**(11): 548-55.
- Aalfs, J. D., G. J. Narlikar, et al. (2001). "Functional differences between the human ATP-dependent nucleosome remodeling proteins BRG1 and SNF2H." J Biol Chem **276**(36): 34270-8.
- Aasland, R., A. F. Stewart, et al. (1996). "The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIB." Trends Biochem Sci **21**(3): 87-8.
- Acconcia, F., P. Ascenzi, et al. (2004). "S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions." Biochem Biophys Res Commun **316**(3): 878-83.
- Alenghat, T., J. Yu, et al. (2006). "The N-CoR complex enables chromatin remodeler SNF2H to enhance repression by thyroid hormone receptor." Embo J **25**(17): 3966-74.
- Anderson, E. (2002). "The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis." Breast Cancer Res **4**(5): 197-201.
- Anstead, G. M., K. E. Carlson, et al. (1997). "The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site." Steroids **62**(3): 268-303.
- Aronica, S. M., W. L. Kraus, et al. (1994). "Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8517-21.
- Assikis, V. J., P. Neven, et al. (1996). "A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis." Eur J Cancer **32A**(9): 1464-76.
- Barak, O., M. A. Lazzaro, et al. (2003). "Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression." Embo J **22**(22): 6089-100.
- Barkhem, T., B. Carlsson, et al. (1998). "Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists." Mol Pharmacol **54**(1): 105-12.
- Becker, P. B. and W. Horz (2002). "ATP-dependent nucleosome remodeling." Annu Rev Biochem **71**: 247-73.
- Becker, P. B., T. Tsukiyama, et al. (1994). "Chromatin assembly extracts from Drosophila embryos." Methods Cell Biol **44**: 207-23.

- Berezney, R. and D. S. Coffey (1974). "Identification of a nuclear protein matrix." Biochem Biophys Res Commun **60**(4): 1410-7.
- Bernstein, L. and R. K. Ross (1993). "Endogenous hormones and breast cancer risk." Epidemiol Rev **15**(1): 48-65.
- Bernstein, L., R. K. Ross, et al. (1990). "Hormone levels in older women: a study of postmenopausal breast cancer patients and healthy population controls." Br J Cancer **61**(2): 298-302.
- Berry, M., D. Metzger, et al. (1990). "Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen." Embo J **9**(9): 2811-8.
- Berry, N. B., M. Fan, et al. (2008). "Estrogen Receptor alpha (ER{alpha}) Hinge-Region Lysines 302 and 303 Regulate Receptor Degradation by the Proteasome." Mol Endocrinol.
- Blobel, G. A., C. A. Sieff, et al. (1995). "Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor." Mol Cell Biol **15**(6): 3147-53.
- Bocchinfuso, W. P. and K. S. Korach (1997). "Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice." J Mammary Gland Biol Neoplasia **2**(4): 323-34.
- Bochar, D. A., J. Savard, et al. (2000). "A family of chromatin remodeling factors related to Williams syndrome transcription factor." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1038-43.
- Bolton, J. L. and G. R. Thatcher (2008). "Potential mechanisms of estrogen quinone carcinogenesis." Chem Res Toxicol **21**(1): 93-101.
- Bourdeau, V., J. Deschenes, et al. (2004). "Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse." Mol Endocrinol **18**(6): 1411-27.
- Boyer, L. A., R. R. Latek, et al. (2004). "The SANT domain: a unique histone-tail-binding module?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 158-63.
- Bozhenok, L., P. A. Wade, et al. (2002). "WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci." Embo J **21**(9): 2231-41.
- Bradbury, E. M. (1992). "Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle." Bioessays **14**(1): 9-16.
- Brzozowski, A. M., A. C. Pike, et al. (1997). "Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor." Nature **389**(6652): 753-8.

- Bunone, G., P. A. Briand, et al. (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." Embo J **15**(9): 2174-83.
- Buzdar, A. U. and J. F. Robertson (2006). "Fulvestrant: pharmacologic profile versus existing endocrine agents for the treatment of breast cancer." Ann Pharmacother **40**(9): 1572-83.
- Callige, M., I. Kieffer, et al. (2005). "CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor {alpha} by the proteasome." Mol Cell Biol **25**(11): 4349-58.
- Campbell, R. A., P. Bhat-Nakshatri, et al. (2001). "Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance." J Biol Chem **276**(13): 9817-24.
- Carlson, M., B. C. Osmond, et al. (1981). "SUC genes of yeast: a dispersed gene family." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **45 Pt 2**: 799-803.
- Castano, E., C. W. Chen, et al. (1998). "The role of phosphorylation in human estrogen receptor function." J Steroid Biochem Mol Biol **65**(1-6): 101-10.
- Castoria, G., A. Migliaccio, et al. (2001). "PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells." Embo J **20**(21): 6050-9.
- Castro-Rivera, E. and S. Safe (2003). "17 beta-estradiol- and 4-hydroxytamoxifen-induced transactivation in breast, endometrial and liver cancer cells is dependent on ER-subtype, cell and promoter context." J Steroid Biochem Mol Biol **84**(1): 23-31.
- Caulin-Glaser, T., G. Garcia-Cardena, et al. (1997). "17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization." Circ Res **81**(5): 885-92.
- Chen, H., R. J. Lin, et al. (1999). "Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase." Cell **98**(5): 675-86.
- Chung, Y. L., M. L. Sheu, et al. (2002). "Resistance to tamoxifen-induced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer." Int J Cancer **97**(3): 306-12.
- Clapier, C. R., G. Langst, et al. (2001). "Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI." Mol Cell Biol **21**(3): 875-83.
- Clapier, C. R., K. P. Nightingale, et al. (2002). "A critical epitope for substrate recognition by the nucleosome remodeling ATPase ISWI." Nucleic Acids Res **30**(3): 649-55.
- Cole, M. P., C. T. Jones, et al. (1971). "A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474." Br J Cancer **25**(2): 270-5.

- Collins, N., R. A. Poot, et al. (2002). "An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin." Nat Genet **32**(4): 627-32.
- Cote, J., J. Quinn, et al. (1994). "Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex." Science **265**(5168): 53-60.
- Coutts, A. S., J. R. Davie, et al. (1996). "Estrogen regulation of nuclear matrix-intermediate filament proteins in human breast cancer cells." J Cell Biochem **63**(2): 174-84.
- Darimont, B. D., R. L. Wagner, et al. (1998). "Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions." Genes Dev **12**(21): 3343-56.
- Dauvois, S., P. S. Danielian, et al. (1992). "Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 4037-41.
- Dauvois, S., R. White, et al. (1993). "The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling." J Cell Sci **106 (Pt 4)**: 1377-88.
- Devin-Leclerc, J., X. Meng, et al. (1998). "Interaction and dissociation by ligands of estrogen receptor and Hsp90: the antiestrogen RU 58668 induces a protein synthesis-dependent clustering of the receptor in the cytoplasm." Mol Endocrinol **12**(6): 842-54.
- Dirscherl, S. S. and J. E. Krebs (2004). "Functional diversity of ISWI complexes." Biochem Cell Biol **82**(4): 482-9.
- Dorgan, J. F., C. Longcope, et al. (1997). "Serum sex hormone levels are related to breast cancer risk in postmenopausal women." Environ Health Perspect **105 Suppl 3**: 583-5.
- Eberharter, A., S. Ferrari, et al. (2001). "Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodelling." Embo J **20**(14): 3781-8.
- Eberharter, A., I. Vetter, et al. (2004). "ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts." Embo J **23**(20): 4029-39.
- Enmark, E., M. Peltö-Huikko, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4258-65.
- Ewing, A. K., M. Attner, et al. (2007). "Novel regulatory role for human Acf1 in transcriptional repression of vitamin D3 receptor-regulated genes." Mol Endocrinol **21**(8): 1791-806.
- Fawell, S. E., R. White, et al. (1990). "Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6883-7.

- Feigelson, H. S. and B. E. Henderson (1996). "Estrogens and breast cancer." Carcinogenesis **17**(11): 2279-84.
- Fillit, H., H. Weinreb, et al. (1986). "Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type." Psychoneuroendocrinology **11**(3): 337-45.
- Fisher, B., J. P. Costantino, et al. (1998). "Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study." J Natl Cancer Inst **90**(18): 1371-88.
- Foidart, J. M., J. Desreux, et al. (2007). "Hormone therapy and breast cancer risk." Climacteric **10 Suppl 2**: 54-61.
- Fondell, J. D., H. Ge, et al. (1996). "Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8329-33.
- Freedman, L. P. (1999). "Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling." Cell **97**(1): 5-8.
- Fryer, C. J. and T. K. Archer (1998). "Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex." Nature **393**(6680): 88-91.
- Fujiki, R., M. S. Kim, et al. (2005). "Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones." Embo J **24**(22): 3881-94.
- Fyodorov, D. V. and J. T. Kadonaga (2002). "Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly." Mol Cell Biol **22**(18): 6344-53.
- Fyodorov, D. V. and J. T. Kadonaga (2002). "Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF." Nature **418**(6900): 897-900.
- Gaub, M. P., M. Bellard, et al. (1990). "Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex." Cell **63**(6): 1267-76.
- Gavin, I., P. J. Horn, et al. (2001). "SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology." Mol Cell **7**(1): 97-104.
- Georgel, P. T., T. Tsukiyama, et al. (1997). "Role of histone tails in nucleosome remodeling by Drosophila NURF." Embo J **16**(15): 4717-26.
- Giamarchi, C., C. Chailleux, et al. (2002). "Two antiestrogens affect differently chromatin remodeling of trefoil factor 1 (pS2) gene and the fate of estrogen receptor in MCF7 cells." Biochim Biophys Acta **1578**(1-3): 12-20.

- Gilligan, D. M., A. A. Quyyumi, et al. (1994). "Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women." Circulation **89**(6): 2545-51.
- Gottardis, M. M. and V. C. Jordan (1987). "Antitumor actions of keoxifene and tamoxifen in the N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinoma model." Cancer Res **47**(15): 4020-4.
- Gottardis, M. M. and V. C. Jordan (1988). "Development of tamoxifen-stimulated growth of MCF-7 tumors in athymic mice after long-term antiestrogen administration." Cancer Res **48**(18): 5183-7.
- Green, P. S. and J. W. Simpkins (2000). "Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action." Int J Dev Neurosci **18**(4-5): 347-58.
- Green, S., P. Walter, et al. (1986). "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A." Nature **320**(6058): 134-9.
- Greene, G. L., P. Gilna, et al. (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." Science **231**(4742): 1150-4.
- Grune, T., J. Brzeski, et al. (2003). "Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI." Mol Cell **12**(2): 449-60.
- Gupta, P. B. and C. Kuperwasser (2006). "Contributions of estrogen to ER-negative breast tumor growth." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 71-8.
- Halachmi, S., E. Marden, et al. (1994). "Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription." Science **264**(5164): 1455-8.
- Harper, M. J. and A. L. Walpole (1966). "Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes." Nature **212**(5057): 87.
- Harper, M. J. and A. L. Walpole (1967). "A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats." J Reprod Fertil **13**(1): 101-19.
- Hart, L. L. and J. R. Davie (2002). "The estrogen receptor: more than the average transcription factor." Biochem Cell Biol **80**(3): 335-41.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, et al. (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-6.
- Herbst, A. L., C. T. Griffiths, et al. (1964). "Clomiphene Citrate (Nsc-35770) in Disseminated Mammary Carcinoma." Cancer Chemother Rep **43**: 39-41.
- Hill, D. A. (2001). "Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling." Biochem Cell Biol **79**(3): 317-24.

- Holst, F., P. R. Stahl, et al. (2007). "Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer." Nat Genet **39**(5): 655-60.
- Holtkamp, D. E., J. G. Greslin, et al. (1960). "Gonadotrophin inhibiting and anti-fecundity effects of chloramiphene." Proc Soc Exp Biol Med **105**: 197-201.
- Howell, A. (2006). "Fulvestrant ('Faslodex'): current and future role in breast cancer management." Crit Rev Oncol Hematol **57**(3): 265-73.
- Htun, H., L. T. Holth, et al. (1999). "Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor." Mol Biol Cell **10**(2): 471-86.
- Improta-Brears, T., A. R. Whorton, et al. (1999). "Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4686-91.
- Ito, M., C. X. Yuan, et al. (1999). "Identity between TRAP and SMCC complexes indicates novel pathways for the function of nuclear receptors and diverse mammalian activators." Mol Cell **3**(3): 361-70.
- Ito, T., M. E. Levenstein, et al. (1999). "ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly." Genes Dev **13**(12): 1529-39.
- Jefcoate, C. R., J. G. Liehr, et al. (2000). "Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens." J Natl Cancer Inst Monogr(27): 95-112.
- Jensen, E. V., G. E. Block, et al. (1971). "Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy." Natl Cancer Inst Monogr **34**: 55-70.
- Jensen, E. V. and E. R. DeSombre (1971). "Effects of ovarian hormones at the subcellular level." Curr Top Exp Endocrinol **1**: 229-69.
- Jensen, E. V., M. Numata, et al. (1971). "Hormone-receptor interaction as a guide to biochemical mechanism." Biochem Soc Symp **32**: 133-59.
- Jeyakumar, M., X. F. Liu, et al. (2007). "Phosphorylation of thyroid hormone receptor-associated nuclear receptor corepressor holocomplex by the DNA-dependent protein kinase enhances its histone deacetylase activity." J Biol Chem **282**(13): 9312-22.
- Jin, Y., Z. Desta, et al. (2005). "CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment." J Natl Cancer Inst **97**(1): 30-9.
- Joel, P. B., A. M. Traish, et al. (1995). "Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor." Mol Endocrinol **9**(8): 1041-52.

- Johnson, C. N., N. L. Adkins, et al. (2005). "Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action." Biochem Cell Biol **83**(4): 405-17.
- Johnston, S. R. (1997). "Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer--potential mechanisms and clinical implications." Anticancer Drugs **8**(10): 911-30.
- Jordan, V. C. (2003). "Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions." J Med Chem **46**(6): 883-908.
- Jordan, V. C. and B. Gosden (1982). "Importance of the alkylaminoethoxy side-chain for the estrogenic and antiestrogenic actions of tamoxifen and trioxifene in the immature rat uterus." Mol Cell Endocrinol **27**(3): 291-306.
- Kahlert, S., S. Nuedling, et al. (2000). "Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway." J Biol Chem **275**(24): 18447-53.
- Kamei, Y., L. Xu, et al. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors." Cell **85**(3): 403-14.
- Kato, S. (2001). "Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways." Breast Cancer **8**(1): 3-9.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-4.
- Kawaguchi, Y., J. J. Kovacs, et al. (2003). "The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress." Cell **115**(6): 727-38.
- Khan, S. A., M. A. Rogers, et al. (1994). "Estrogen receptor expression of benign breast epithelium and its association with breast cancer." Cancer Res **54**(4): 993-7.
- Khosla, S., L. J. Melton, 3rd, et al. (1998). "Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2266-74.
- Kingston, R. E. and G. J. Narlikar (1999). "ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity." Genes Dev **13**(18): 2339-52.
- Kistner, R. W. and O. W. Smith (1960). "Observations on the use of a non-steroidal estrogen antagonist: MER-25." Surg Forum **10**: 725-9.
- Kitagawa, H., R. Fujiki, et al. (2003). "The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome." Cell **113**(7): 905-17.

- Klein-Hitpass, L., M. Kaling, et al. (1988). "Synergism of closely adjacent estrogen-responsive elements increases their regulatory potential." J Mol Biol **201**(3): 537-44.
- Klouche, M. (2006). "Estrogens in human vascular diseases." Ann N Y Acad Sci **1089**: 431-43.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 5925-30.
- Kushner, P. J., D. A. Agard, et al. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 311-7.
- Lantin-Hermoso, R. L., C. R. Rosenfeld, et al. (1997). "Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium." Am J Physiol **273**(1 Pt 1): L119-26.
- Lavinsky, R. M., K. Jepsen, et al. (1998). "Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2920-5.
- Li, L., M. P. Haynes, et al. (2003). "Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4807-12.
- Lipfert, L., J. E. Fisher, et al. (2006). "Antagonist-induced, activation function-2-independent estrogen receptor alpha phosphorylation." Mol Endocrinol **20**(3): 516-33.
- Long, X. and K. P. Nephew (2006). "Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor-alpha." J Biol Chem **281**(14): 9607-15.
- Lubahn, D. B., J. S. Moyer, et al. (1993). "Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11162-6.
- Luger, K., A. W. Mader, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." Nature **389**(6648): 251-60.
- Lupien, M., M. Jeyakumar, et al. (2007). "Raloxifene and ICI182,780 increase estrogen receptor-alpha association with a nuclear compartment via overlapping sets of hydrophobic amino acids in activation function 2 helix 12." Mol Endocrinol **21**(4): 797-816.
- Lusser, A. and J. T. Kadonaga (2003). "Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines." Bioessays **25**(12): 1192-200.

- Maggi, A., P. Ciana, et al. (2004). "Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions." Annu Rev Physiol **66**: 291-313.
- Mahfoudi, A., E. Roulet, et al. (1995). "Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(10): 4206-10.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Marino, M., F. Acconcia, et al. (2002). "Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells." Mol Biol Cell **13**(10): 3720-9.
- Marsaud, V., A. Gougelet, et al. (2003). "Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells." Mol Endocrinol **17**(10): 2013-27.
- Matsuda, K., M. Nishi, et al. (2008). "Intranuclear mobility of estrogen receptor alpha and progesterone receptors in association with nuclear matrix dynamics." J Cell Biochem **103**(1): 136-48.
- McClelland, R. A., D. Barrow, et al. (2001). "Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex)." Endocrinology **142**(7): 2776-88.
- McClelland, R. A., J. M. Gee, et al. (1996). "Short-term effects of pure anti-oestrogen ICI 182780 treatment on oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-alpha protein expression in human breast cancer." Eur J Cancer **32A**(3): 413-6.
- McEwen, B. S. and S. E. Alves (1999). "Estrogen actions in the central nervous system." Endocr Rev **20**(3): 279-307.
- McInerney, E. M., D. W. Rose, et al. (1998). "Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation." Genes Dev **12**(21): 3357-68.
- Merot, Y., R. Metivier, et al. (2004). "The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell." J Biol Chem **279**(25): 26184-91.
- Metivier, R., G. Penot, et al. (2001). "Synergism between ERalpha transactivation function 1 (AF-1) and AF-2 mediated by steroid receptor coactivator protein-1: requirement for the AF-1 alpha-helical core and for a direct interaction between the N- and C-terminal domains." Mol Endocrinol **15**(11): 1953-70.

- Metivier, R., F. G. Petit, et al. (2000). "Function of N-terminal transactivation domain of the estrogen receptor requires a potential alpha-helical structure and is negatively regulated by the A domain." Mol Endocrinol **14**(11): 1849-71.
- Metivier, R., A. Stark, et al. (2002). "A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains." Mol Cell **10**(5): 1019-32.
- Metzger, D., R. Losson, et al. (1992). "Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast." Nucleic Acids Res **20**(11): 2813-7.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, et al. (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." Embo J **15**(6): 1292-300.
- Migliaccio, A., M. Pagano, et al. (1993). "Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells." Oncogene **8**(8): 2183-91.
- Miller, W. R. and J. O'Neill (1987). "The importance of local synthesis of estrogen within the breast." Steroids **50**(4-6): 537-48.
- Monje, P. and R. Boland (1999). "Characterization of membrane estrogen binding proteins from rabbit uterus." Mol Cell Endocrinol **147**(1-2): 75-84.
- Monje, P., S. Zanello, et al. (2001). "Differential cellular localization of estrogen receptor alpha in uterine and mammary cells." Mol Cell Endocrinol **181**(1-2): 117-29.
- Montano, M. M., V. Muller, et al. (1995). "The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists." Mol Endocrinol **9**(7): 814-25.
- Muchardt, C. and M. Yaniv (1999). "ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job." J Mol Biol **293**(2): 187-98.
- Nilsson, S., S. Makela, et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-65.
- Norris, J. D., D. Fan, et al. (1998). "Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology." J Biol Chem **273**(12): 6679-88.
- O'Neill, J. S. and W. R. Miller (1987). "Aromatase activity in breast adipose tissue from women with benign and malignant breast diseases." Br J Cancer **56**(5): 601-4.

- O'Regan, R. M., C. Osipo, et al. (2006). "Development and therapeutic options for the treatment of raloxifene-stimulated breast cancer in athymic mice." Clin Cancer Res **12**(7 Pt 1): 2255-63.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." Science **270**(5240): 1354-7.
- Osborne, C. K., E. B. Coronado-Heinsohn, et al. (1995). "Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer." J Natl Cancer Inst **87**(10): 746-50.
- Pace, P., J. Taylor, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha." J Biol Chem **272**(41): 25832-8.
- Pappas, T. C., B. Gametchu, et al. (1995). "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding." Faseb J **9**(5): 404-10.
- Parfitt, A. M., R. Travers, et al. (2000). "Structural and cellular changes during bone growth in healthy children." Bone **27**(4): 487-94.
- Parikh, I., W. L. Anderson, et al. (1980). "Identification of high affinity estrogen binding sites in calf uterine microsomal membranes." J Biol Chem **255**(21): 10266-70.
- Parker, M. G. (1993). "Action of "pure" antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action." Breast Cancer Res Treat **26**(2): 131-7.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1977). "Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells." Nature **265**(5589): 69-72.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (2000). "A structural biologist's view of the oestrogen receptor." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 261-8.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (1999). "Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist." Embo J **18**(17): 4608-18.
- Pike, A. C., A. M. Brzozowski, et al. (2001). "Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen." Structure **9**(2): 145-53.
- Porter, W., B. Saville, et al. (1997). "Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor." Mol Endocrinol **11**(11): 1569-80.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocr Rev **18**(3): 306-60.
- Prentice, R. L. (1990). "Tamoxifen as a potential preventive agent in healthy postmenopausal women." J Natl Cancer Inst **82**(16): 1310-1.

- Ray, A., K. E. Prefontaine, et al. (1994). "Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor." J Biol Chem **269**(17): 12940-6.
- Reid, G., M. R. Hubner, et al. (2003). "Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling." Mol Cell **11**(3): 695-707.
- Riggs, B. L., S. Khosla, et al. (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." Endocr Rev **23**(3): 279-302.
- Robertson, D. W., J. A. Katzenellenbogen, et al. (1982). "Antiestrogen basicity--activity relationships: a comparison of the estrogen receptor binding and antiuterotrophic potencies of several analogues of (Z)-1,2-diphenyl-1-[4-[2-(dimethylamino)ethoxy]phenyl]-1-butene (tamoxifen, Nolvadex) having altered basicity." J Med Chem **25**(2): 167-71.
- Rochette-Egly, C. (2003). "Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation." Cell Signal **15**(4): 355-66.
- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, et al. (1999). "Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex." J Biol Chem **274**(32): 22296-302.
- Russo, I. H. and J. Russo (1996). "Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies." Environ Health Perspect **104**(9): 938-67.
- Russo, J. and I. H. Russo (2006). "The role of estrogen in the initiation of breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **102**(1-5): 89-96.
- Santen, R. J., S. J. Santner, et al. (1997). "Estrogen production via the aromatase enzyme in breast carcinoma: which cell type is responsible?" J Steroid Biochem Mol Biol **61**(3-6): 267-71.
- Savkur, R. S. and T. P. Burris (2004). "The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif." J Pept Res **63**(3): 207-12.
- Shang, Y. (2007). "Hormones and cancer." Cell Res **17**(4): 277-9.
- Shang, Y. and M. Brown (2002). "Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs." Science **295**(5564): 2465-8.
- Shang, Y., X. Hu, et al. (2000). "Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription." Cell **103**(6): 843-52.
- Sherwin, B. B. (1997). "Estrogen effects on cognition in menopausal women." Neurology **48**(5 Suppl 7): S21-6.

- Shiau, A. K., D. Barstad, et al. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-37.
- Simpson, E., G. Rubin, et al. (2000). "The role of local estrogen biosynthesis in males and females." Trends Endocrinol Metab **11**(5): 184-8.
- Simpson, E. R. and S. R. Davis (2001). "Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis--some new perspectives." Endocrinology **142**(11): 4589-94.
- Singh, S., D. Chakravarti, et al. (2005). "Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma." Oncol Rep **14**(4): 1091-6.
- Smetana, K. and H. Busch (1963). "On the Ultrastructure of the Walker 256 Carcinosarcoma." Cancer Res **23**: 1600-3.
- Smith, C. L., Z. Nawaz, et al. (1997). "Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen." Mol Endocrinol **11**(6): 657-66.
- Spencer, V. A., A. S. Coutts, et al. (1998). "Estrogen regulates the association of intermediate filament proteins with nuclear DNA in human breast cancer cells." J Biol Chem **273**(44): 29093-7.
- Stearns, V., M. D. Johnson, et al. (2003). "Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine." J Natl Cancer Inst **95**(23): 1758-64.
- Steger, D. J. and J. L. Workman (1999). "Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes." Methods **19**(3): 410-6.
- Stein, B. and M. X. Yang (1995). "Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta." Mol Cell Biol **15**(9): 4971-9.
- Stenoien, D. L., M. G. Mancini, et al. (2000). "Subnuclear Trafficking of Estrogen Receptor- α and Steroid Receptor Coactivator-1." Mol Endocrinol **14**(4): 518-534.
- Stenoien, D. L., A. C. Nye, et al. (2001). "Ligand-mediated assembly and real-time cellular dynamics of estrogen receptor α -coactivator complexes in living cells." Mol Cell Biol **21**(13): 4404-12.
- Stenoien, D. L., K. Patel, et al. (2001). "FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor- α is ligand- and proteasome-dependent." Nat Cell Biol **3**(1): 15-23.

- Stierer, M., H. Rosen, et al. (1993). "Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors." Ann Surg **218**(1): 13-21.
- Stoecklin, E., M. Wissler, et al. (1999). "Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family." J Steroid Biochem Mol Biol **69**(1-6): 195-204.
- Stopka, T. and A. I. Skoultchi (2003). "The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(24): 14097-102.
- Stunnenberg, H. G. (1993). "Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors." Bioessays **15**(5): 309-15.
- Sudarsanam, P. and F. Winston (2000). "The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control." Trends Genet **16**(8): 345-51.
- Terenius, L. (1971). "Structure-activity relationships of anti-oestrogens with regard to interaction with 17-beta-oestradiol in the mouse uterus and vagina." Acta Endocrinol (Copenh) **66**(3): 431-47.
- Toniolo, P. G., M. Levitz, et al. (1995). "A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women." J Natl Cancer Inst **87**(3): 190-7.
- Toran-Allerand, C. D., A. A. Tinnikov, et al. (2005). "17alpha-estradiol: a brain-active estrogen?" Endocrinology **146**(9): 3843-50.
- Umayahara, Y., R. Kawamori, et al. (1994). "Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer." J Biol Chem **269**(23): 16433-42.
- Van Den Bemd, G. J., G. G. Kuiper, et al. (1999). "Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability." Biochem Biophys Res Commun **261**(1): 1-5.
- Varshochi, R., F. Halim, et al. (2005). "ICI182,780 induces p21Waf1 gene transcription through releasing histone deacetylase 1 and estrogen receptor alpha from Sp1 sites to induce cell cycle arrest in MCF-7 breast cancer cell line." J Biol Chem **280**(5): 3185-96.
- Voegel, J. J., M. J. Heine, et al. (1998). "The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways." Embo J **17**(2): 507-19.
- Wakeling, A. E. (1995). "Use of pure antioestrogens to elucidate the mode of action of oestrogens." Biochem Pharmacol **49**(11): 1545-9.

- Wakeling, A. E. and J. Bowler (1987). "Steroidal pure antioestrogens." J Endocrinol **112**(3): R7-10.
- Wakeling, A. E., M. Dukes, et al. (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Res **51**(15): 3867-73.
- Warmmark, A., T. Almlof, et al. (2001). "Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta." J Biol Chem **276**(26): 23397-404.
- Warmmark, A., A. Wikstrom, et al. (2001). "The N-terminal regions of estrogen receptor alpha and beta are unstructured in vitro and show different TBP binding properties." J Biol Chem **276**(49): 45939-44.
- Webb, P., G. N. Lopez, et al. (1995). "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." Mol Endocrinol **9**(4): 443-56.
- Webb, P., P. Nguyen, et al. (2003). "Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo." J Biol Chem **278**(9): 6912-20.
- Webb, P., P. Nguyen, et al. (1999). "The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions." Mol Endocrinol **13**(10): 1672-85.
- Weigel, N. L. and Y. Zhang (1998). "Ligand-independent activation of steroid hormone receptors." J Mol Med **76**(7): 469-79.
- Weinmann, A. S., P. S. Yan, et al. (2002). "Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis." Genes Dev **16**(2): 235-44.
- Wijayarathne, A. L. and D. P. McDonnell (2001). "The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators." J Biol Chem **276**(38): 35684-92.
- Winston, F. and M. Carlson (1992). "Yeast SNF/SWI transcriptional activators and the SPT/SIN chromatin connection." Trends Genet **8**(11): 387-91.
- Wolf, D. M. and V. C. Jordan (1994). "The estrogen receptor from a tamoxifen stimulated MCF-7 tumor variant contains a point mutation in the ligand binding domain." Breast Cancer Res Treat **31**(1): 129-38.
- Wood, J. R., G. L. Greene, et al. (1998). "Estrogen response elements function as allosteric modulators of estrogen receptor conformation." Mol Cell Biol **18**(4): 1927-34.

- Wu, Y. L., X. Yang, et al. (2005). "Structural basis for an unexpected mode of SERM-mediated ER antagonism." Mol Cell **18**(4): 413-24.
- Xu, H. E., T. B. Stanley, et al. (2002). "Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha." Nature **415**(6873): 813-7.
- Yager, J. D. and N. E. Davidson (2006). "Estrogen carcinogenesis in breast cancer." N Engl J Med **354**(3): 270-82.
- Yasui, D., M. Miyano, et al. (2002). "SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances." Nature **419**(6907): 641-5.
- Yuan, C. X., M. Ito, et al. (1998). "The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7939-44.
- Zwart, W., A. Griekspoor, et al. (2007). "PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERalpha towards co-activator SRC-1." Embo J **26**(15): 3534-44.

Annexes

Contribution des collaborateurs

La figure 12 A a été réalisée par Mathieu Lupien dans le cadre de l'article (Lupien, Jeyakumar et al. 2007).

L'expérience de FRAP menant à la figure 13 a été réalisée conjointement avec David-Cotnoir White qui a réalisé les fusions des mutants de l'hélice H12 à la YFP.

L'expérience qui a mené à l'identification du complexe hACF à la figure 17 a été réalisée par Nader Hussein, ma contribution consistait en la réalisation de la fusion HEG0-pC-3XFlag et à l'assistance technique.

L'expérience qui a mené à la figure 20 a été réalisée par Éric Duplan, ma contribution consistait en la réalisation de la fusion HEG0-pC-3XFlag et à l'assistance technique.