

Université de Montréal

Étude fonctionnelle du couplage chimiokine-estrogène dans les tissus reproducteurs

Par

Samira Benhadjeba

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maitre ès Sciences M.Sc

En Biochimie

Option Générale

Décembre 2012

© Samira Benhadjeba, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Étude fonctionnelle du couplage chimiokine-estrogène dans
les tissus reproducteurs**

Présentée par:

Samira Benhadjeba

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Pascal Chartrand, président-rapporteur

Dr. André Tremblay, directeur de recherche

Dr. Johnny Deladoëy, membre du jury

Résumé

Les estrogènes sont impliqués dans plusieurs aspects de la physiologie humaine en particulier, le développement, la croissance, la différenciation des tissus reproducteurs, la reproduction, et la grossesse. Les effets cellulaires des estrogènes sont transmis via l'interaction avec les récepteurs des estrogènes ER α et ER β . L'activation de ER α et ER β contrôle directement la transcription des gènes cibles nécessaires pour médier les effets physiologiques des estrogènes. L'effet des estrogènes peut aussi être mitogénique et devient la cause de plusieurs pathologies surtout dans les tissus qui présentent une sensibilité accrue à l'hormone tel que les tissus mammaires, les ovaires et l'utérus. De ce fait, une surexposition de ces tissus à l'estrogène augmente le risque de développer le cancer. Dans une lignée cellulaire qui coexprime les deux récepteurs, nous avons identifié la chimiokine SDF-1 qui interagit avec le récepteur CXCR4 et qui décrit une boucle de régulation autocrine/paracrine entre la voie des chimiokines et celle des estrogènes. Cette régulation induit une augmentation de l'expression des gènes cibles prolifératifs du cancer du sein. Cependant, les mécanismes exacts de cette régulation restent inconnus. Afin d'identifier les cibles exactes de cette régulation au niveau génomique, nous avons développé un modèle cellulaire pour discriminer le rôle respectif de ER α et ER β au niveau du contrôle transcriptionnel de cette boucle de régulation des chimiokines.

En partant d'une lignée cellulaire ER-, nous avons généré un système cellulaire qui exprime l'un ou l'autre des isoformes en plus du mutant ER β -S87A. Nous avons construit le promoteur CXCR4bLuc qu'on a testé dans les lignées cellulaires générées. En utilisant la construction du promoteur CXCR4bLuc, nous avons démontré une voie de régulation des récepteurs des chimiokines par les récepteurs des estrogènes. L'activation membranaire de CXCR4 par SDF-1 implique l'activation directe du récepteur de l'estrogène ER β par phosphorylation de la sérine 87. Cette phosphorylation active ER β et favorise l'expression du gène de CXCR4. La transcription de CXCR4 passe par la liaison de ER β au niveau d'un élément de liaison ERE que nous avons identifié dans ce travail par la technique de CHIP. Ainsi, nous avons identifié une cible exacte de la régulation des récepteurs des chimiokines

CXCR4 par le récepteur des estrogènes ER β qui peut constituer une approche prometteuse pour contrer les pathologies associées au cancer du sein et ses métastases.

Mots-clés : Estrogène, récepteur de l'estrogène, cancer du sein, chimiokine, SDF-1, CXCR4

Abstract

Estrogens are involved in development, growth, differentiation, reproduction, and pregnancy. The cellular effects of estrogens are mediated through its interaction with estrogen receptors ER α and ER β . The ER α and ER β activation controls directly the transcription of target genes required to mediate the physiological effects of estrogen. The effect of estrogen may be mitogenic and becomes the cause of many diseases especially in tissues that have greater sensitivity to the hormone such as breast tissue, ovaries and uterus. Therefore, overexposure of these tissues to estrogen increases the risk of developing cancer. In a cell line that co-expresses both receptors, we identified the chemokine SDF-1 that interacts with the CXCR4 receptor and describes an autocrine / paracrine loop pathway between chemokines and estrogen. This control leads to an increase of the expression of proliferatives target genes in breast cancer. However, the exact mechanisms of this regulation remain unknown. To identify the exact target of this regulation at the genomic level, we have developed a cellular model to discriminate the respective role of ER α and ER β level of transcriptional control of the loop chemokines.

Starting from an ER- cell line, we generated a cell system that expresses one or other of isoforms in addition to the mutant ER β -S87A. We built the promoter CXCR4bLuc that we have tested in the generated cell lines. Using the CXCR4bLuc promoter construct, we have demonstrated a regulatory pathway of chemokine receptors by estrogen receptors. The membrane activation of CXCR4 by SDF-1 involves the direct activation of estrogen receptor ER β by phosphorylation of serine 87. This phosphorylation leads to activate ER β and promotes the expression of CXCR4 gene. The transcription of CXCR4 involves the binding of ER β at an ERE binding element that we have identified in this work by the ChIP technical. Thus the identification of a precise ERE target regulation of chemokine receptors CXCR4 by estrogen receptor ER β , is a promising approach to counter the pathologies associated with breast cancer and its metastases.

Keywords : Estrogen, estrogen receptor, breast cancer, chemokine, SDF-1, CXCR4.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
1. Introduction.....	1
1.1. Les estrogènes.....	1
1.2. Rôles physiologique des estrogènes.....	2
1.3. Les récepteurs des estrogènes.....	3
1.4. Structure des ERs.....	4
1.4.1. Le domaine N-terminal.....	4
1.4.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD).....	5
1.4.3. Le domaine D.....	5
1.4.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD).....	6
1.4.5. Le domaine C-terminal.....	6
1.5. Rôle biologique des ERs.....	6
1.5.1. Rôle dans le système reproducteur.....	7
1.5.2. Rôle dans l'os.....	8
1.5.3. Rôle dans le système cardio-vasculaire.....	8
1.5.4. Rôle dans le système nerveux central.....	8
1.6. Pertinence et redondance entre ER α et ER β	9
1.7. Mécanisme d'action des ERs.....	9
1.7.1. Activation du ER.....	9
1.7.2. Corégulateurs transcriptionnels.....	11
1.7.2.1. Les coactivateurs.....	11
1.7.2.2. Les corépresseurs.....	12
1.7.3. Mécanisme d'action classique des ERs.....	13
1.7.3.1. Interaction directe ER-ADN.....	13

1.7.4.	Mécanisme d'action non classique des ERs	14
1.7.4.1.	ERE-indépendant	14
1.7.4.2.	Ligand-indépendant	14
1.7.5.	Mécanisme d'action non-génomique des ERs	15
1.8.	Régulation des ERs	15
1.8.1.	La phosphorylation	16
1.8.2.	Phosphorylation des ERs	16
1.8.2.1.	Phosphorylation de ER α	17
1.8.2.2.	Phosphorylation de ER β	18
1.9.	Les implications pathologiques des ERs	19
1.9.2.	Rôle des ERS dans le cancer du sein	19
1.10.	Les chimiokines	21
1.10.1.	Structure des chimiokines	21
1.10.2.	Fonction des chimiokines	23
1.10.3.	La chimiokine CXCL12/SDF-1	24
1.11.	Les récepteurs des chimiokines	25
1.11.1.	Le récepteur CXCR4	27
1.11.1.1.	Signalisation de CXCR4	28
1.11.1.2.	Rôle de CXCR4	29
1.12.	CXCR4 et SDF-1 dans le cancer du sein	30
2.	Hypothèse et objectifs	33
3.	Matériels et méthodes	34
3.1.	Vecteurs d'expression et clonage moléculaire	34
3.2.	Culture cellulaire	35
3.3.	Transfection transitoire et essai luciférase	35
3.4.	Western blot	36
3.5.	Extraction d'ARN et qPCR	36
3.6.	Génération de clones stables MDA-MB-231-ER	37
3.7.	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	38
3.8.	Prolifération cellulaire	39
4.	Résultats	40

4.1.	L'activité transcriptionnelle des ERs répond à l'estrogène	40
4.2.	ER régulent la transcription des gènes cibles	42
4.3.	ER est exprimé stablement dans les lignées 231	43
4.4.	E2 et SDF-1 induisent la prolifération cellulaire des lignées stables 231-ER	45
4.5.	Régulation transcriptionnelle de CXCR4 par les estrogènes	48
5.	Discussion	53
	Conclusion	62
	Biographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par PCR et mutagenèse par PCR

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par qPCR

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par qPCR

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des hormones stéroïdiennes.	2
Figure 2 : Structure des récepteurs des estrogènes	4
Figure 3 : Éléments de réponse aux estrogènes.	5
Figure 4 : Distribution tissulaire de ER dans l'organisme.	7
Figure 5: Différents mécanismes d'action des ERs.	10
Figure 6 : Les corégulateurs transcriptionnels des ERs.	13
Figure 7 : Mécanisme général de la phosphorylation.	16
Figure 8 : Représentation des différents sites de phosphorylation sur les ERs.	19
Figure 9 : Configuration des 4 classes de chimiokines.	22
Figure 10 : Effets métastatiques de SDF-1.	25
Figure 11 : Structure générale des récepteurs des chimiokines.	26
Figure 12 : Signalisation de la voie CXCR4/SDF-1.	29
Figure 13 : L'effet métastatique de SDF-1 et CXCR4 dans le cancer du sein.	31
Figure 14 : Représentation de la boucle de régulation entre ER et CXCR4/SDF-1.	32
Figure 15 : L'estrogène induit l'activation des ERs.	41
Figure 17 : Niveau de ER α et ER β dans les lignées stables MDA-MB-231.	45
Figure 18 : Prolifération cellulaire des cellules cancéreuses 231 en réponse à E2.	47
Figure 19 : SDF-1 contribue à la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses de façon dépendante en réponse à SDF-1.	48
Figure 20 : Analyse de CXCR4 dans les MCF-7.	49
Figure 21 : Régulation transcriptionnelle du promoteur de CXCR4 par ER α et ER β	50
Figure 22 : Recrutement de ER α et ER β au niveau des EREs localisés dans les régions promotrices de PR et CXCR4.	52
Figure 23 : Modèle proposé de l'axe de régulation transcriptionnelle ER β -CXCR4 dans les cellules cancéreuses.	60

Liste des abréviations

%	pourcentage
°C	degrés Celsius
aa	acide aminé
AD1	activation domaine 1
AD2	activation domaine 2
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AF-1	activation fonction 1
AF-2	activation fonction 2
AP-1	activating protein 1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adenosine triphosphate
CBP	CREB-binding protein
ChIP	Chromatine immunoprecipitated
Ct	cycle threshold
DBD	DNA Binding Domaine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRIP205	Vitamin D-interacting Protein 205
E1	estradiol
E2	estrone
E3	estriol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
ERE	Élément de réponse à l'oestrogène
ERs	les récepteurs des estrogènes
ESR1	gène encodant ER α

ESR2	gène encodant ER β
FBS	foetal bovin serum
FGF	fibroblast growth factor
GPCR	récepteurs couplés à la protéine G
HDAC	Histone desacétylase
HDL	high density lipoprotein
HIF- α	Hypoxia inducible factor-1 α
Hsp90	Heat shok protein 90
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
Kb	kilo bases
KDa	kilo Dalton
KO	knock out
LBD	ligand binding domaine
LRP16	gène encodant la proteine LRP16 pour leukemia
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MTP	modifications post-traductionnelles
NaCl	chlorure de sodium
N-CoR	nuclear Hormone Corepressor
NF- κ B	nuclear factor kappa B
Pb	paire de base
PEI	polyethylenimine
PI3k	phosphoinositide 3-kinase
PIC	protease inhibitor cocktail
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyl
PR	Récepteur de la progesterone
PRMT	protein Argenin Methyl Transferase
RIP140	receptor Interacting Protein 140
SDF-1	de stromal cell-derived factor 1
SDS	dodécylsulfate de sodium

SMRT	silencing mediator of retinoic and thyroid hormone Receptors
SRC	Steroid Receptor Coactivator
TBS	tris buffer salin
TGF	transforming growth factor
TH2	type 2 helper
TRAP220	Thyroid receptor-associated proteincomplex 220 kDa
VEGF	vascular endothelial growth factor
ΔC_t	différence dans cycle threshold

*À la personne que j'aime le plus au monde, ma
fille Meriem.*

À Boumediene et mes parents.

À mes frères et sœurs

Au Saint qui a changé ma vie

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier sincèrement mon directeur de recherche le Dr. André Tremblay d'avoir eu confiance en moi en m'accueillant dans son laboratoire et me donner l'opportunité d'y faire ma maîtrise. Je le remercie pour son aide, pour ses idées, pour son appui, ses compétences, sa grande patience et sa disponibilité pendant tout ce temps.

Je remercie aussi également mes collègues de laboratoire en particulier Karine Sauvé, merci pour ta patience et ta grande disponibilité à répondre à mes nombreuses questions, Meryl Hassan, Stéphanie Bilodeau, l'assistante Véronique Caron, Sarah Keil et enfin un grand merci à Lydia Edjekouane de m'avoir beaucoup aidé avec ses compétences sur les différentes techniques indispensables à mon travail, j'ai eu beaucoup de plaisir de t'avoir comme collègue.

Je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenue de continuer dans la recherche et encouragée malgré les 8000 km qui nous séparent.

Un remerciement spécial à mon époux Boumediene, qui a toujours su m'appuyer et si je me suis rendu aussi loin dans le parcours de mes études c'est certainement grâce à toi. À travers ce travail j'espère te rendre fière de moi et fière de tout le temps que tu as consacré à mettre tous les moyens en ma faveur durant ces deux années de maîtrise.

1. Introduction

1.1. Les estrogènes

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes et se trouvent sous trois formes soient le 17β -œstradiol (E2) qui est la forme la plus efficace et la plus biologiquement active appelée communément estrogène, suivi de l'estrone (E1) lequel est plus actif que l'estriol (E3). Les estrogènes sont biosynthétisés à partir du cholestérol (Figure 1) dans les follicules ovariens, le corps jaune et le placenta chez les femmes (1) et dans les testicules chez les hommes (2). Les gonades synthétisent l'œstrogène à partir du cholestérol, mais surtout à partir de la DHEA (déhydroépiandrostérone surrénalienne) circulant provenant de la surrénale. En effet, la synthèse des hormones stéroïdiennes débute quelques minutes après la stimulation de l'hormone corticotrope (ACTH hypophysaire), s'ensuit comme première étape la conversion du cholestérol qui est clivé en pregnolone (Figure 1). La prochaine étape est la conversion du pregnolone en diverses hormones actives sous forme d'intermédiaires. Alors que peu d'organes sont capables de synthétiser les stéroïdes à partir du cholestérol, la plupart des organes peuvent transformer les stéroïdes circulants comme la DHEA qui est convertie en testostérone dans les tissus périphériques. Les testicules et les ovaires n'ont pas la capacité de faire la synthèse d'aldostérone et le cortisol. Le métabolisme des stéroïdes dans les testicules et les ovaires cible la synthèse des androgènes et des estrogènes, tandis que la progestérone est produite par le corps jaune de l'ovaire et la testostérone est biosynthétisée dans le testicule (3).

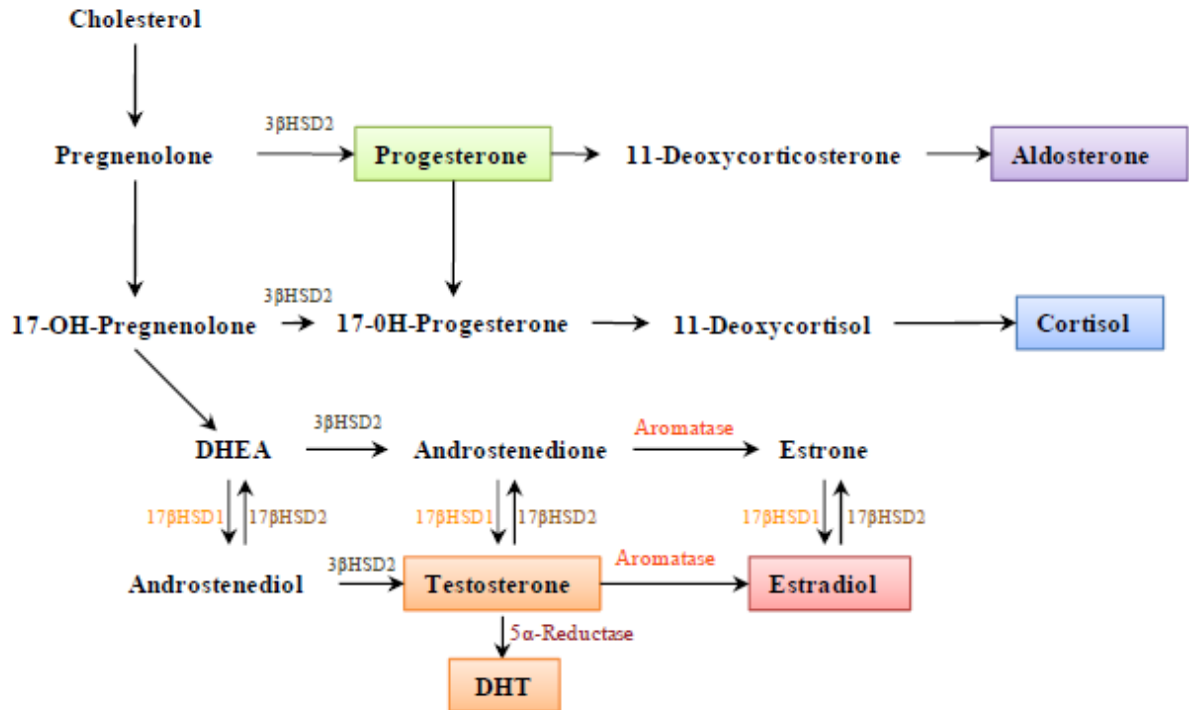


Figure 1 : Biosynthèse des hormones stéroïdiennes.

La synthèse de la progestérone se fait au niveau des ovaires alors que la synthèse de l'estrogène et les androgènes est faite par les testicules et les ovaires. Image adaptée de (4)

1.2. Rôles physiologiques des estrogènes

Les estrogènes sont impliqués dans la croissance, le développement et la différenciation des systèmes reproducteurs mâles et femelles. Chez les femmes, ils stimulent la croissance et la maturation des organes reproducteurs durant la puberté. Durant la grossesse, les estrogènes stimulent la croissance de l'utérus et agissent sur le développement des glandes mammaires (5). Chez les hommes, l'estrogène est responsable de la maturation des spermatozoïdes (6).

Les estrogènes agissent aussi au niveau des tissus périphériques. Dans le système cardiaque, les estrogènes ont des effets cardioprotecteurs car ils stimulent l'oxyde nitrique synthase endothéliale eNOS (7) et la prostacycline dans les cellules endothéliales

ce qui induit une vasodilatation rapide et de courte durée (8). De plus, les estrogènes diminuent les taux des LDL (low density lipoproteince), ce qui leur confère un effet anti-athérosclérotique (9).

Également, dans le système osseux, les estrogènes ont un effet anti-résorbant en inhibant les ostéoclastes, ce qui permet de réduire les risques de fractures chez les femmes souffrant d'ostéoporose (10). Chez les deux sexes, l'œstrogène est responsable de la fermeture de la plaque de croissance épiphysaire lors de la puberté.

De plus, les estrogènes agissent comme neuro-protecteurs en contribuant au remodelage synaptique et dendritique (11) Au niveau du système nerveux, la propriété antioxydante des estrogènes réduit la génération des peptides β -amyloïdes de la maladie d'Alzheimer (12). Ainsi, le risque de la maladie d'Alzheimer chez les femmes post ménopausée serait relié à la chute de production des estrogènes (13).

Il a été démontré que le manque ou la surabondance des estrogènes est la cause de plusieurs pathologies (14). L'action de l'estrogène peut être mitogénique dans les tissus qui sont sensibles à l'hormone comme les tissus mammaires, l'utérus et les ovaires (15). En effet, une exposition plus prolongée à l'estrogène augmente le risque de développer le cancer du sein ou des ovaires (16)

Pour médier tous ces effets physiologiques, l'estrogène doit interagir avec des récepteurs, soient les récepteurs des estrogènes.

1.3. Les récepteurs des estrogènes

La découverte de ER (Estrogen Receptor) revient aux travaux de Jensen et Jacobson dans les années 1960 (17), l'injection de E2 marqué au tritium chez le rat a permis de démontrer que E2 n'est retenu que par certains tissus cibles de l'hormone ce qui a permis d'émettre l'hypothèse d'éventuel récepteur pour E2. Le récepteur des estrogènes a été isolé en 1966 (18). Par la suite, le gène codant pour ER α a été cloné en 1985 à partir de tissus mammaires (19) puis séquencé en 1986 (20). L'autre isoforme de ER, ER β n'a été découvert qu'en 1996 chez le rat (21) puis chez la souris (22) et enfin l'humain (23).

Les récepteurs des estrogènes sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui comprend 48 membres. Chez l'humain, les deux isoformes des récepteurs des estrogènes ER α et ER β sont codés par les gènes *ESR1* et *ESR2* respectivement. Leur structure est composée de 6 domaines (24) (Figure 2).

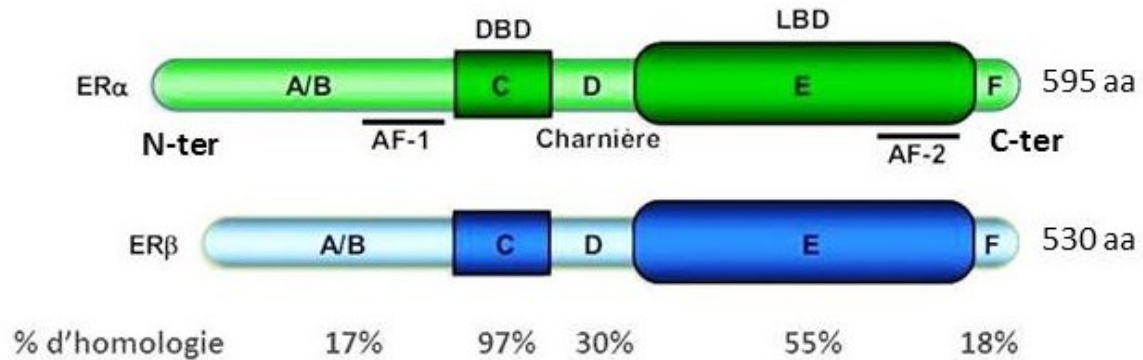


Figure 2 : Structure des récepteurs des estrogènes

Les régions N-terminales et C-terminales des ERs (Estrogen Receptors) contiennent le domaine AF-1 (Activation Function 1) et le LBD (Ligand Binding Domaine) respectivement, la région charnière se trouve dans le domaine D et enfin, la région E/F contient le domaine DBD (DNA binding domaine) et aussi le domaine AF-2 (activation function 2). Le pourcentage d'homologie dans chaque domaine entre les isoformes ER α et le RE β est représenté ainsi que le nombre d'acides aminés. Adaptée de (23)

1.4. Structure des ERs

Les récepteurs des estrogènes sont des facteurs de transcription nucléaires, leur structure est formée des domaines N-terminal, DBD, région charnière, LBD et C-terminal contenus dans 6 régions A-B-C-D-E-F (25).

1.4.1. Le domaine N-terminal

Comme montré dans la figure 2, ce domaine contient les régions (A/B) et on y trouve aussi le domaine d'activation AF-1 qui est impliqué dans l'activation du récepteur de façon hormone-indépendante par le recrutement des cofacteurs transcriptionnels (26).

La région AF-1 est connue pour être instable et c'est la phosphorylation qui la stabilise (27). Aussi, la AF-1 est très variable entre les récepteurs, on trouve seulement 17 % d'homologie entre le ER α et ER β (28).

1.4.2. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Ce domaine se trouve dans la région C (Figure 2), et il permet la liaison du récepteur à l'ADN. Au niveau du DBD, on retrouve un motif appelé doigt de zinc, il permet la dimérisation du récepteur en plus de reconnaître une séquence palindromique d'ADN appelée ERE (élément de réponse à l'estrogène). ERE est retrouvée dans les promoteurs des gènes cibles. Le domaine DBD est le plus conservé entre les récepteurs nucléaires avec 97% d'homologie entre ER α et ER β ce qui permet aux deux isoformes de se lier sur la même séquence (25, 28) (Figure 3).

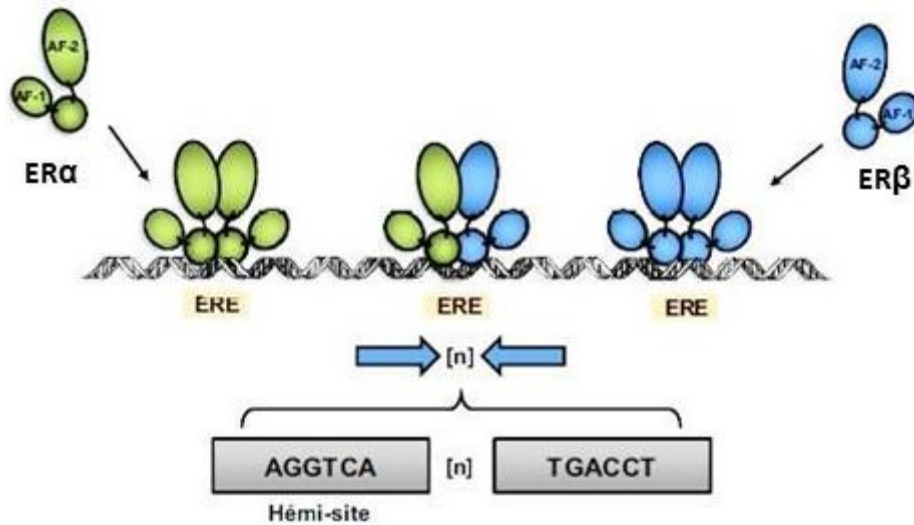


Figure 3 : Éléments de réponse aux estrogènes.

Orientation des éléments de réponse et les différentes configurations de dimérisations possibles de ER. Les flèches indiquent l'orientation du demi-site et [n] qui est de 3 pour ER, représente de nombre d'acides aminés séparant les demi-sites.

1.4.3. Le domaine D

Le domaine D contient la région charnière. C'est la structure flexible de la région charnière qui facilite la dimérisation de ER, l'interaction de ER avec l'ADN et la

coordination entre les domaines (AF) (29). Il a été démontré que la région charnière est responsable de la transduction du signal de la localisation nucléaire du récepteur. La région charnière joue un rôle important dans la régulation des isoformes par les modifications post-traductionnelles tel que la phosphorylation et la sumoylation (30).

1.4.4. Le domaine de liaison du ligand (LBD)

Le LBD est contenu dans les régions (E/F) (Figure 2), et contient le domaine d'activation (AF-2). Il est caractérisé par l'existence de l'hélice- α H12 qui permet l'activation des récepteurs de façon ligand-dépendante. L'interaction du LBD avec la protéine du choc thermique Hsp90 provoque la localisation nucléaire du récepteur. De plus, le LBD est impliqué dans l'homo et l'hétérodimérisation des ERs (Figure 3). Enfin comme son nom l'indique, le LBD assure la liaison du ligand. Dépendamment si le ligand est un agoniste ou un antagoniste, l'hélice- α H12 adoptera différentes conformations. Dans le cas d'un agoniste l'hélice se positionne sur la cavité de liaison du ligand et se referme générant ainsi AF-2 prête à recruter les coactivateurs transcriptionnels, tandis que l'antagoniste ne permet pas le positionnement adéquat de l'hélice ce qui empêchera AF-2 de s'activer (31, 32).

1.4.5. Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal se trouve dans la région F, son rôle est peu connu, mais des études ont démontré que le domaine F est requis pour l'activation de ER α par le tamoxifène (33). Le domaine C-terminal est aussi impliqué dans les modifications requises pour permettre l'interaction entre les récepteurs et les corégulateurs (34). Entre ER α et ER β on retrouve seulement 18% d'homologie dans la région F (Figure 2) ce qui suggère un contrôle sélectif dans l'activité des récepteurs (33)

1.5. Rôle biologique des ERs

Le rôle biologique que jouent les ERs dans l'organisme dépend de deux facteurs, soit la distribution tissulaire des ERs et les différences structurales entre les deux isoformes de ER. Dépendamment de l'organe, le niveau d'expression de ER α et ER β peut varier, ou bien l'un des deux domine ou se limite à un type tissulaire (Figure 4).

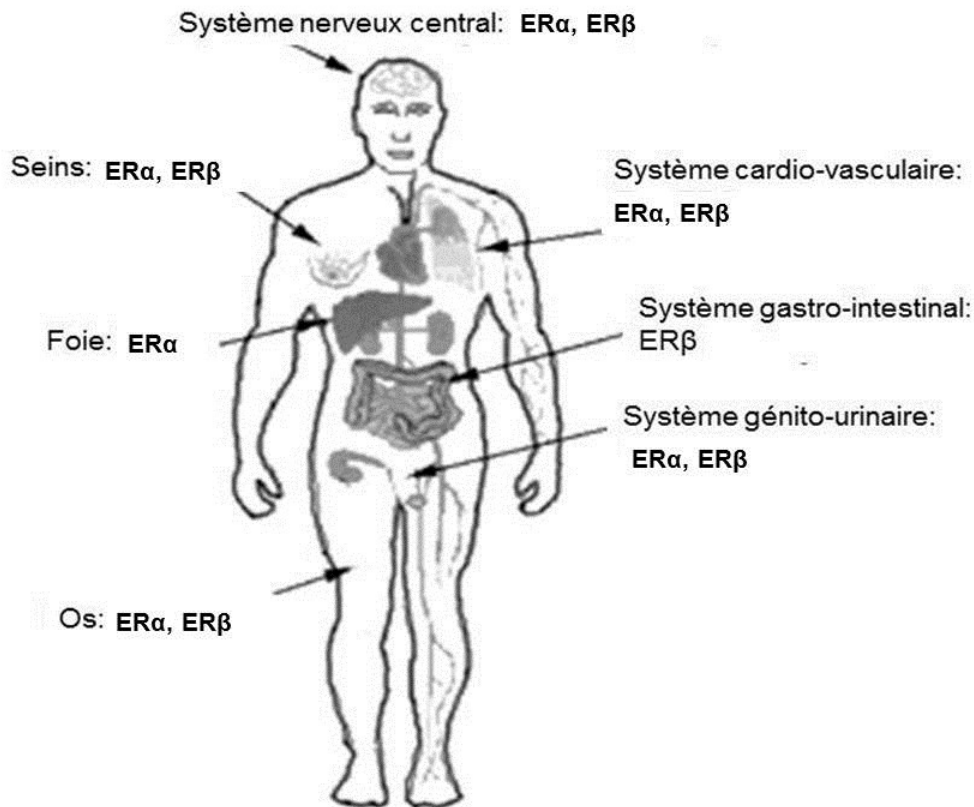


Figure 4 : Distribution tissulaire de ER dans l'organisme.

Certains tissus coexpriment ER α et ER β alors que d'autres tissus se limitent à l'un ou l'autre des deux isoformes. Adaptée de (35)

1.5.1. Rôle dans le système reproducteur

Dans le but d'évaluer le rôle physiologique de chacun des isoformes, des souris (Knock Out, KO) en ER α et ER β ont été générées (36). Au niveau du système reproducteur, il a été observé que l'invalidation de ER α n'est pas létale mais cause de l'infertilité chez les deux sexes. En outre, chez la femelle, on a observé une absence d'ovulation, ainsi qu'une arborisation déficiente des tissus mammaires peu développés, démontrant ainsi un rôle crucial de ER α dans la reproduction et le développement des caractères sexuels a été mis en évidence (37). Par ailleurs, les souris mâles et femelles déficientes en ER β demeurent fertiles et le développement des glandes mammaires ainsi

que la lactation sont normaux (38), démontrant un rôle essentiel de ER β au niveau des tissus reproducteurs. Il a aussi été démontré que la présence de ER β est essentielle pour accomplir l'ovulation chez les souris femelles (39). Des souris doubles déficientes pour le ER α et ER β ont aussi été générées, elles présentent le même phénotype que pour les souris déficientes en ER α quant à la viabilité et l'infertilité. Elles présentent un développement normal des caractères reproducteurs chez le mâle mais déficient chez la femelle tout comme les souris invalidées en ER α (40).

1.5.2. Rôle dans l'os

L'invalidation de ER α chez les souris cause une diminution dans la résorption osseuse démontrant le rôle anti-apoptotique de ER α sur les ostéoblastes. Les souris KO pour ER α démontraient également une déficience dans la croissance et maturation osseuse, contrairement aux souris invalidées en ER β qui présentent une densité osseuse normale (41), suggérant un rôle essentiel de ER α dans la maturation et l'intégrité osseuse. C'est pourquoi des agonistes comme l'estrogène E2 et le raloxifène sont souvent prescrits chez les femmes ménopausées à risque de fracture (14).

1.5.3. Rôle dans le système cardio-vasculaire

Au niveau du système cardiovasculaire, le rôle cardioprotecteur de E2 a été attribué à ER α et non à ER β tel que démontré par les modèles de souris Knock Out. Le mécanisme moléculaire de cette protection peut s'expliquer par l'augmentation du niveau des HDL (High density lipoprotein) suite à la régulation bénéfique du cholestérol par l'estrogène (42).

1.5.4. Rôle dans le système nerveux central

La localisation des ERs dans les neurones implique directement leur effet dans la formation des synapses (43). Les études menées sur des souris invalidées en ER β attribuent à cet isoforme un rôle important dans le développement morphologique adéquat du cerveau et aussi dans la migration et la survie neuronale (44, 45). Certaines études relient ER β au comportement émotionnel du fait que les souris déficientes en ER β démontrent une augmentation de l'anxiété et de la plasticité synaptique (46). De plus,

l'interaction des ERs avec l'estrogène réduit la génération neuronale des peptides bêta-amyloïdes diminuant ainsi le risque à la maladie d'Alzheimer (13).

1.6. Pertinence et redondance entre ER α et ER β

La différence dans la distribution tissulaire de ER α et ER β pouvait expliquer l'effet spécifique de l'estrogène dans chaque tissu. Cependant, d'autres études ont pu octroyer la spécificité tissulaire au type de l'hétérodimère formé par les isoformes. Effectivement, il a été démontré que si les deux isoformes sont coexprimés, ils formeront un hétérodimère qui lie ERE (Figure 3) avec la même affinité que s'il s'agissait de l'homodimère ER α (47-49). Ce qui a mené à la conclusion que la régulation de certains gènes n'est faite que par l'hétérodimère ER α /ER β . Ainsi, l'expression des gènes en réponse à l'estrogène est une conséquence du ratio d'expression des ERs. Un exemple du profil d'expression génique a été réalisé au niveau de cellules cancéreuses du sein de type MCF-7 en réponse à l'estrogène. L'étude a démontré que parmi les 921 gènes régulés, ER β semble interférer en activant ou en inhibant l'action de ER α sur 171 gènes cibles de ER α en permettant la régulation de 516 gènes (50). Certains des gènes régulés par les ERs sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires dont la mort cellulaire, la différenciation, la mobilité ainsi que dans la transduction de signaux cellulaires (51).

1.7. Mécanisme d'action des ERs

1.7.1. Activation du ER

L'activation de ER peut se faire de façon dépendante du ligand par l'intermédiaire du domaine AF-2 ou indépendante du ligand impliquant cette fois-ci le domaine AF-1, cette activation induit par la suite le recrutement de ER au niveau des éléments ERE. Par la suite de l'activation de ER, la réponse peut être génomique ou non génomique (non transcriptionnelle). L'action génomique se traduit par la voie classique où ER interagit directement avec l'ADN en se liant sur les ERE, ou bien par la voie non classique où le ER se lie à d'autres facteurs de transcription déjà liés sur l'ADN (52). L'action non génomique de ER exige que ce dernier soit attaché au niveau de la membrane plasmique

interne grâce à un adaptateur ou bien dans le cytosol pour activer différentes voies de signalisation comme la voie MAPK et PI3K/Akt (53, 54) (Figure 5).

En absence de son ligand, ER adopte la forme monomérique et est lié au complexe protéique du choc thermique constitué de la protéine chaperonne Hsp90 et l'immunophiline (55). À la liaison de E2, ER se dissocie de son chaperon, se dimérise et subit des changements conformationnels qui rendent le domaine AF-2 actif, qui à son tour permet l'activation transcriptionnelle de ER. De ces changements conformationnels résultent l'exposition des sites de reconnaissance pour les coactivateurs qui vont alors favoriser l'ouverture de la chromatine et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. La transcription peut être altérée par le recrutement des corépresseurs. Une fois activé, le complexe ER-E2 se lie au niveau des promoteurs des gènes cibles pour induire leur expression et favorisera l'augmentation ou la diminution de leur ARNm (56).

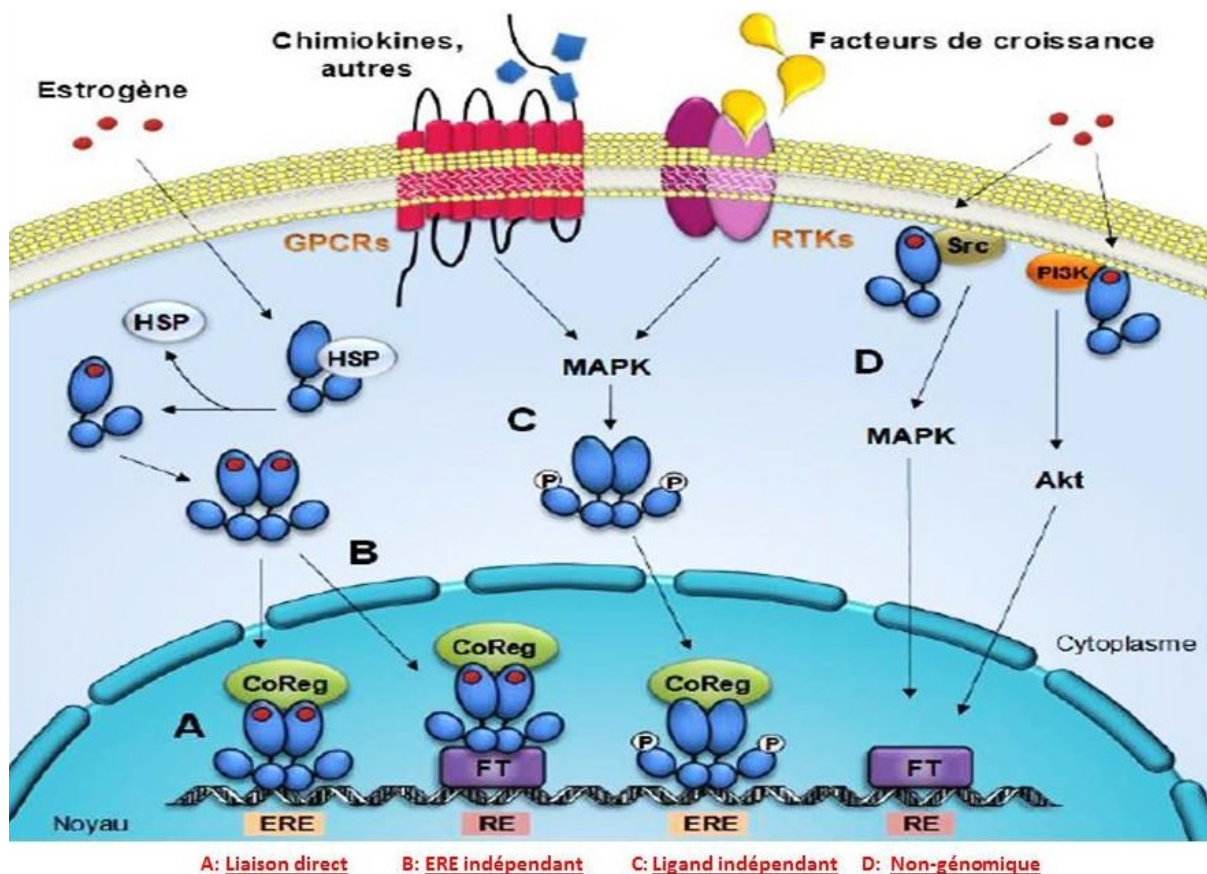


Figure 5: Différents mécanismes d'action des ERs.

Les récepteurs des estrogènes s'activent par la voie classique (A), ERE-indépendante (B), de façon ligand-indépendante suite à la phosphorylation par les MAPK et enfin de façon non génomique (D). Adaptée de (57)

1.7.2. Corégulateurs transcriptionnels

Les corégulateurs regroupent les coactivateurs et les corépresseurs qui sont recrutés par ER, ils agissent sur le remodelage de la chromatine et la modification des histones de telle sorte à permettre ou non la transcription. Pendant que les coactivateurs favorisent l'ouverture de la chromatine par mécanisme d'acétylation via leur activité histone acétyltransférase, les corépresseurs vont favoriser la condensation de la chromatine par le mécanisme de désacétylation via l'histone déacétylase (HDAC) (58, 59) (Figure 6)

1.7.2.1. Les coactivateurs

Les coactivateurs transcriptionnels sont incapables de lier directement l'ADN, mais par contre, ils lient les facteurs de transcription. L'effet direct des coactivateurs est d'augmenter l'expression génique en modulant positivement l'activité transcriptionnelle des ERs. Pour initier la transcription, il faut d'abord que les promoteurs soient accessibles à la machinerie transcriptionnelle. Pour ce faire, les coactivateurs recrutés vont induire divers changements conformationnels comme la décondensation de la chromatine favorisée entre autre par PRMT1 (Protein Arginine Methyl Transferase 1) et CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyl Transferase 1) (Figure 6) (60). L'interaction de PRMT1 et CARM1 avec ER passe par leur recrutement par d'autres coactivateurs comme SRC (Steroid receptor coactivator) et CBP/p300 (CREB-binding protein) (Figure 6). Les SRC sont importants pour la régulation de ER, ils possèdent plusieurs domaines d'interaction, un domaine qui contient le motif LXXLL (L:Leucine, x:n'importe quel acide aminé) qui leur permet d'interagir avec ER via le domaine AF-2, un domaine AD1 qui permet le recrutement de CBP/p300 et un domaine AD2 qui interagit avec PRMT1 et CARM1 (61-63). Il existe trois isoformes de SRC (SRC-1, SRC-2 et SRC-3), leur surexpression dans les tissus malins comparativement aux tissus sains laisse croire que les SRC ont un rôle dans le développement du cancer (64) ainsi que dans la résistance

aux traitements anti-estrogéniques du cancer du sein (65). Bien que ER α et ER β semblent similaires pour le recrutement des coactivateurs à motif LXXLL, des études ont démontré que le recrutement de certains coactivateurs comme TRAP220 (Thyroid receptor-associated protein complex 220 kDa) dépend de la spécificité de la liaison du domaine F de chaque isoforme avec le motif LXXLL du coactivateur en question (33). TRAP220 est connu pour interagir avec un autre coactivateur. En effet, TRAP220 se trouve dans le même complexe avec DRIP205 (Vitamin D-interacting Protein 205) et ensemble, ils agissent comme régulateurs positifs de l'activation transcriptionnelle ligand-dépendant des ERs (66)

1.7.2.2. Les corépresseurs

À l'instar des coactivateurs, les corépresseurs favorisent la répression génique. Ils confèrent un mécanisme cellulaire pour restreindre la réponse hormonale. Des études cliniques ont montré que la perte des corépresseurs peut être à l'origine du développement de plusieurs types de cancers, ainsi qu'à la résistance à l'hormonothérapie (67). Les corépresseurs sont recrutés par ER suite à l'action des antagonistes dans le but d'inhiber l'activité de ER (68). Tout comme les coactivateurs, les corépresseurs ne lient pas directement l'ADN, ils sont recrutés par ER et ce grâce à leur domaine LXXLL. Certains corépresseurs comme RIP140 (Receptor Interacting Protein 140), N-CoR (Nuclear Hormone Corepressor) et SMART (Silencing Mediator of Retinoic and thyroid hormone Receptors) (en rouge dans la figure 6) interagissent avec AF-2 de ER en entrant en compétition avec les coactivateurs et recrutent à leur tour un autre corépresseur comme ceux de la famille des HDAC pour empêcher la liaison du coactivateur SRC-1 (59), et c'est en fonction de l'isoforme de ER et du ligand que les corépresseurs sont recrutés. Par exemple, en présence du tamoxifène, ER α recrute N-CoR tandis que SMRT est recruté par ER β (56).

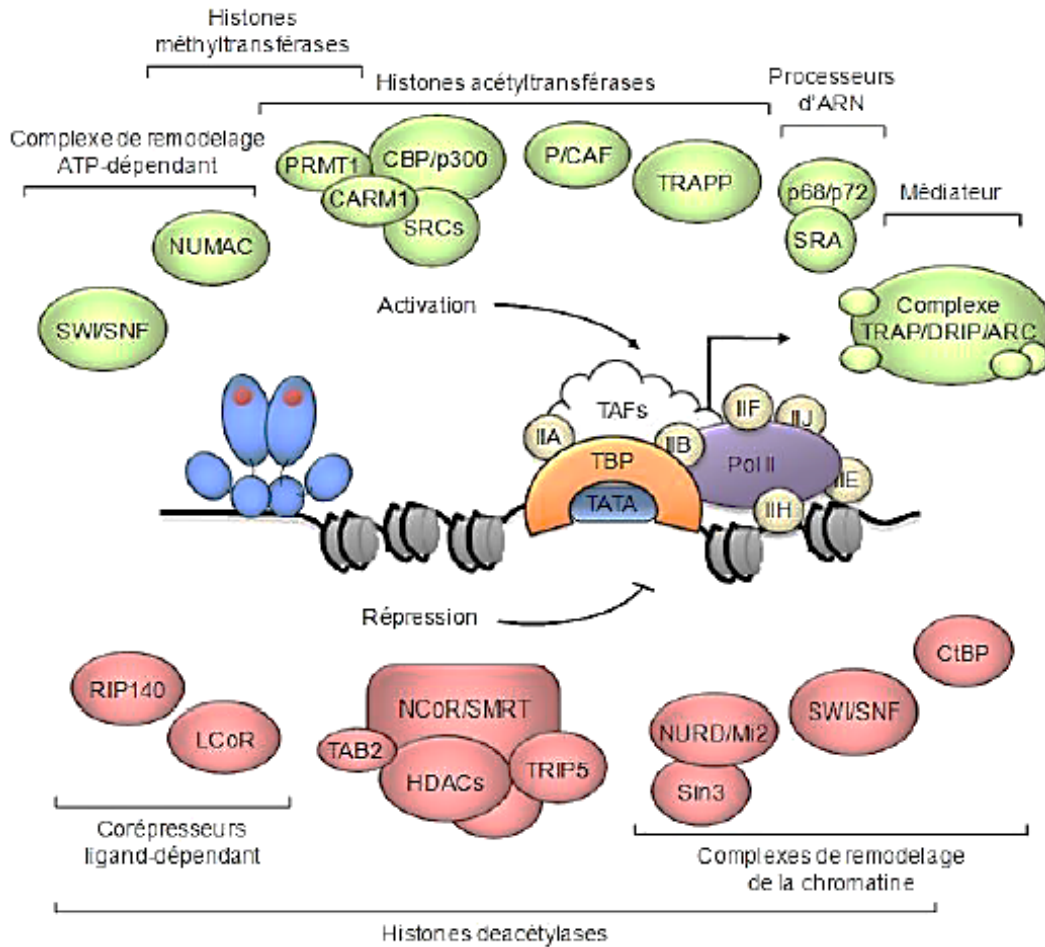


Figure 6 : Les corégulateurs transcriptionnels des ERs.

Schéma des différents coactivateurs (en vert) et corépresseurs (en rouge) impliqués dans l'activité transcriptionnelle des ERs. Adaptée de (62)

1.7.3. Mécanisme d'action classique des ERs

1.7.3.1. Interaction directe ER-ADN

Le mécanisme d'action classique des ERs fait intervenir les domaines AF-1 et AF-2. En effet, à la liaison du ligand, ER s'active et se détache de Hsp, et par la suite il est recruté au niveau des EREs des promoteurs des gènes cibles (Figure 5A). C'est grâce à son DBD que ER lie l'ADN au niveau de ERE qui est une séquence palindromique parfaite et inversée (Figure 3). On retrouve environ 60 000 EREs dans le génome humain dont la plupart sont imparfaits et non palindromique, et seulement quelques gènes régulés

par ER possèdent un ERE parfait. Les EREs peuvent être proximal ou bien distal en aval de la région promotrice (69).

1.7.4. Mécanisme d'action non classique des ERs

1.7.4.1. ERE-indépendant

Le mécanisme d'action non classique des ERs leur donne la capacité de réguler la transcription des gènes sans l'interaction directe avec l'ADN. En effet, une grande variété de gènes sont régulés par ER sans toutefois lier directement un ERE. Dans ce cas-là, ER régule la transcription de ces gènes par un autre type de mécanisme (70). Dans ce mécanisme, l'activité transcriptionnelle passe par la liaison de ER sur un autre facteur de transcription déjà lié sur l'ADN tel que AP-1 (Activating Protein 1) qui lui-même lie d'autres facteurs de transcription Fos/Jun. Tout ça forme un complexe sur les promoteurs des gènes cibles (Figure 5B) tel que le gène c-myc (70, 71). D'autres facteurs de transcription qui sont connus pour interagir avec ER tel que sp1 (Specificity protein 1) et NF-kB (Nuclear factor kappa B) sont également affectés par la liaison avec ER(72).

1.7.4.2. Ligand-indépendant

Les ERs sont également activés en absence de leur ligand, et ce grâce à leur domaine AF-1 qui est directement régulé par phosphorylation. Ce mécanisme d'activation a été mis en évidence en 1990 suite à l'administration d'EGF (Epidermal Growth Factor) ou TGF- β (Transforming Growth Factor beta) à des souris ovariectomisées, qui provoquait des effets similaires à ceux observés en traitant avec l'estrogène (73). Ce mécanisme est initié par la liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires respectifs, déclenchant diverses voies de signalisation impliquant les kinases telles que MAPKs Erk1/2 et p38, PI3K/Akt, PKA et PKC. Ces kinases vont alors phosphoryler directement ER au niveau de l'AF-1 pour provoquer leur translocation nucléaire, leur interaction avec l'ADN et leur activation transcriptionnelle (Figure 5C) (74).

1.7.5. Mécanisme d'action non génomique des ERs

Le mécanisme d'action non génomique des ERs se produit rapidement contrairement au mécanisme génomique qui prend quelques heures pour se produire. Ce mécanisme d'activation est exclusif des ERs extranucléaires, qui doivent être attachés à la membrane interne ou bien dans le cytoplasme. En réponse à l'estrogène, ER α membranaire s'active et interagit avec les récepteurs membranaires tel que IGF-1R, EGFR et ErbB2 (75), ER α peut aussi interagir avec les kinases tel que Src et PI3K ce qui activera les cascades de phosphorylation. Ces cascades qui vont dans le noyau pour activer d'autres facteurs de transcription. Ceci mène à comprendre que la voie nongénomique est non transcriptionnelle pour ER mais l'est pour d'autres facteurs de transcription (Figure 5D), Ainsi, les actions génomiques et non génomiques des ERs ne sont pas mutuellement exclusives, mais convergent plutôt entre elles et se complètent (54, 76-79).

1.8. Régulation des ERs

La régulation des ERs se fait principalement par les modifications post-traductionnelles (MPT).. On compte plusieurs MPT, dont la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation, la méthylation, la palmitoylation et la glycosylation qui sont impliquées dans divers processus de régulation, comme la localisation cellulaire, la stabilité et la conformation des ERs, leur sensibilité envers le ligand, leur interaction avec l'ADN et aussi le recrutement de leurs cofacteurs (57, 80). La régulation de ER α par les MPT est beaucoup plus caractérisée que celle de l'isoforme ER β . En effet, jusqu'à maintenant on en a répertorié près de 22 sites ciblés par les MPT pour ER α (81). Grâce aux études récentes qui visent la caractérisation des sites de régulation de ER β , on a démontré que les MPT font diverger les fonctions de chaque isoforme. Parmi les MPT connues, la phosphorylation permet de soulever les différences fonctionnelles entre ER α et ER β , principalement au niveau du domaine le moins conservé entre les ERs soit le domaine AF-1 : Parmi les MPT connues, la phosphorylation permet de tracer les différences fonctionnelles entre ER α et ER β , principalement au niveau du domaine le moins conservé entre les ERs soit le domaine AF-1. (80)

1.8.1. La phosphorylation

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée, elle est impliquée dans plusieurs processus de régulation cellulaires en ce qui est de la transduction des signaux extracellulaire en les rendant spécifique à une réponse cellulaire interne. L'action de la phosphorylation consiste à modifier l'activité d'un substrat (Figure 7). La phosphorylation joue un rôle important dans différents processus, dont la transcription, le métabolisme, le maintien du cycle cellulaire, le réarrangement du cytosquelette et aussi dans l'apoptose et la différenciation cellulaire (82).

La phosphorylation est un mécanisme réversible qui se définit par l'ajout d'un groupement phosphate provenant de l'adénosine de l'ATP (Adénosine triphosphate) sur l'hydroxyle d'un acide aminé d'une protéine cible catalysé par le biais d'une kinase à l'inverse de la phosphatase qui catalyserait la réaction inverse soit la déphosphorylation (Figure 7).

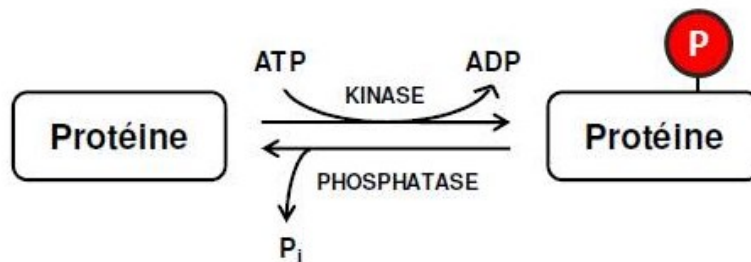


Figure 7 : Mécanisme général de la phosphorylation.

L'ajout d'un groupement phosphate (P) sur une protéine se fait par la kinase et son enlèvement se fait par la phosphatase.

1.8.2. Phosphorylation des ERs

Tel que discuté, la phosphorylation est un processus impliqué dans l'activation ligand-indépendante des ERs. La phosphorylation se fait principalement sur des résidus sérines ou thréonine faisant partie d'un motif Ser/Thr-Pro au niveau du domaine AF-1 suite principalement à l'activation des MAPKs. On ne retrouve qu'un seul site de

phosphorylation conservé entre les deux isoformes (83), c'est donc au niveau des autres sites non conservés que se distingue l'activité AF-1 de chaque ER.

1.8.2.1. Phosphorylation de ER α

Il existe plusieurs sites de phosphorylation du récepteur ER α présents sur les différents domaines du récepteur, mais surtout en particulier dans la région N-terminale. Ces sites sont principalement des résidues sérines, mais il peut aussi s'agir de phosphorylation sur des résidus thréonine et tyrosine, tel que montré à la figure 8.

Un des sites sans doute le plus caractérisé de ER α est la serine 118. L'activation de la voie Ras-MAPK par les facteurs de croissance EGF et IGF (Insulin-like growth factor 1 receptor) ainsi que l'action des kinases MAPK, Cdk7, IKK α , GSK-3 et ERK7, induisent la phosphorylation de la Ser-118 (84-88). La phosphorylation de Ser-118 *pS118* va favoriser l'activation de ER α dépendamment et indépendamment du ligand et aussi le recrutement des coactivateurs SRC-1 et CBP (89). ER α peut aussi être phosphorylé au niveau de la Ser-167 (Résidu sérine 167) en réponse à EGF en plus des kinases Akt et S6K1 (90).

Il a été démontré que la *pS167* active et stabilise le récepteur et en plus de favoriser la prolifération dans les cellules cancéreuses du sein, la phosphorylation de S167 est responsable en partie de la résistance au tamoxifène (91). D'autres sérines sont ciblées par les facteurs de croissance soient la S104 et S106 qui sont phosphorylées par Erk1/2 en réponse à E2 et d'autres kinases comme Src (86, 92).

La transactivation de ER α suite à la phosphorylation des deux sérines S194 et S106, permettra l'action du tamoxifène (93). Il est connu que les GPCR (Récepteur couplé aux protéines G) activent la PKA (Protéine kinase A), cette kinase régule les sérines 236 et 305 qui vont à leur tour exercer leurs effets sur ER α . Pendant que la S236 stabilise et protège ER α contre la dégradation (94, 95), de son côté la S305 favorise sa dimérisation et sa liaison à l'ADN en plus de favoriser l'action du tamoxifène par le recrutement de SRC-1 (96, 97).

1.8.2.2. Phosphorylation de ER β

Les sites potentiels à la phosphorylation sur ER β sont montrés à la figure 8. Les sérines 106 et 124 sont phosphorylées suite à l'induction des MAPKs et Erk1/2 par EGF. L'action activatrice de la phosphorylation de *pS106* et *pS124* réside dans le recrutement de SRC-1 et CBP (49, 98), aussi, en concert avec la S94, la S106 favorise la stabilité et la mobilité de ER β (99) en plus de la dégradation du récepteur par le protéasome. La dégradation du récepteur est également favorisée par la phosphorylation de la sérine 255 en réponse à la voie PI3K/Akt activée par ErbB2/ErbB3. La Ser-255 induit l'ubiquitination de ER β déjà présent dans un complexe avec CBP et E3-ubiquitine ligase Mdm2 (100).

On a récemment identifié la sérine 87 comme étant une cible de phosphorylation par les MAPKs en réponse à l'activation du récepteur membranaire CXCR4 par son ligand la chimiokine CXCL12/SDF-1, et ce en présence ou en absence de l'estrogène. Une fois phosphorylée, la *pS87* active ER β et augmente la croissance des cellules cancéreuses du sein (101).

Un autre site impliqué dans le processus de la dégradation de ER β est la Ser-60, localisée dans une région qui constitue un signal pour la dégradation protéosomique. Une fois phosphorylée, la *pS60* mène à la dégradation de même que l'activation du récepteur (102), il faut aussi noter que la S60 qui peut être le siège d'une glycosylation et à l'encontre de la phosphorylation, la glycosylation stabilise ER β et diminue son activité transcriptionnelle (103).

ER β peut également être phosphorylé au niveau des sérines 6, 8 et 12 par l'action de GSK-3 β , ce qui favorisera la sumoylation du récepteur et par conséquent le protège contre la dégradation par l'ubiquitination (104).

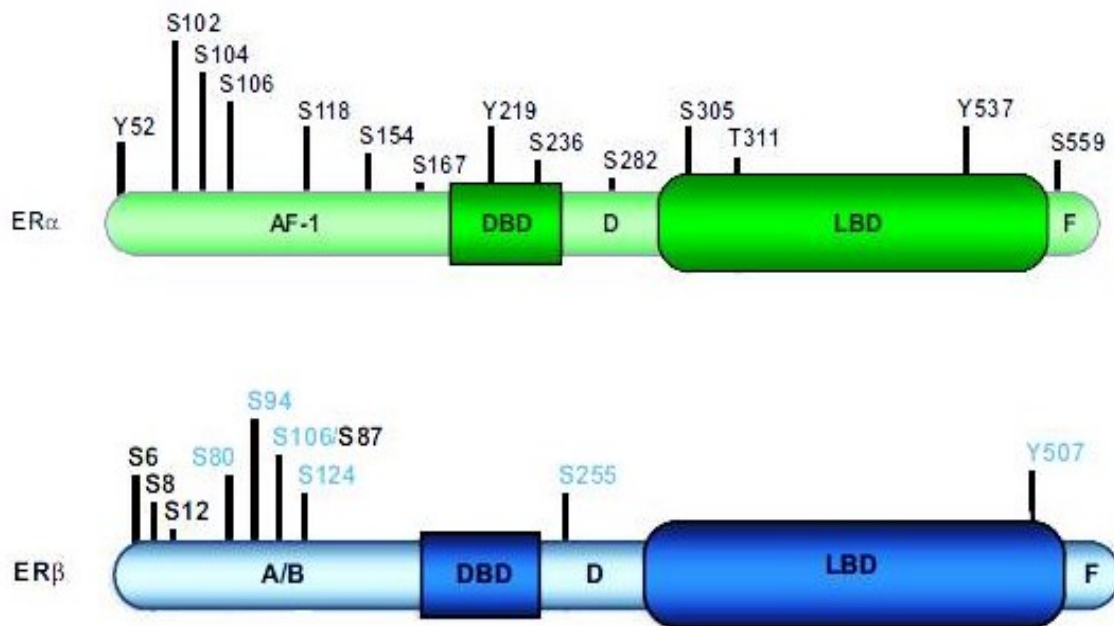


Figure 8 : Représentation des différents sites de phosphorylation sur les ERs.

Les sites de phosphorylation en noir sont ceux identifiés chez l'humain, en bleu sont les sites identifiés chez la souris, murin. Adaptée de (80)

1.9. Les implications pathologiques des ERs

Compte tenu de la large implication des ERs dans les différents processus physiologiques tels que son influence sur les systèmes nerveux et cardiovasculaire, la reproduction et l'intégrité osseuse, plusieurs pathologies sont associées à une dérégulation de la réponse estrogénique. Il ne serait donc pas étonnant que la surexpression ou encore la diminution des estrogènes et leur récepteurs soient à l'origine de plusieurs pathologies comprenant, entre autres, différents types de cancer, les maladies cardio-vasculaires, la neurodégénérescence et les maladies métaboliques comme la résistance à l'insuline et l'obésité (105).

1.9.2. Rôle des ERs dans le cancer du sein

Certains cancers hormono-dépendant partagent le même mécanisme qui repose sur la prolifération cellulaire induite par la surexpression des tissus à l'hormone comme dans le cas pour le cancer du sein(106). En effet, beaucoup d'études ont démontré le

risque accru de développer le cancer du sein chez les femmes post-ménopausées qui suivent l'hormonothérapie (107-109). L'action tumorale des estrogènes dans le tissu mammaire passe principalement par ER α . Il existe une corrélation positive de ER α dans le cancer du sein. En effet, ER α est associé au bon pronostic puisque les tumeurs ER α + peuvent être traitées avec les anti-estrogènes (110). Étant un facteur de transcription, ER α a aussi la possibilité de réguler certains gènes cibles comme le LRP16 (leukemia related protein 16), Myc, cycline D ou encore Wnt11 qui ont pour effet respectif d'interférer avec les cadhérines, stimuler le cycle cellulaire, favoriser le passage de G1 à S et altérer l'apoptose, le tout conduira à la prolifération cellulaire accrue où la division cellulaire peut provoquer des erreurs dans la réplication de l'ADN, pour ainsi donner naissance à de nombreuses mutations favorisant le cancer (111-113). L'implication directe de ER α dans le développement et la progression tumorale lui confère un rôle de cible thérapeutique dans le traitement du cancer de sein. En effet, pour contrer l'action de ER, des antagonistes ont été développés pour contrer l'interaction du récepteur avec l'estrogène à l'origine de son activation. En particulier, le tamoxifène et l'antagoniste complet l'ICI 182,780. Toutefois, les traitements au tamoxifène ne sont jamais définitifs chez les patientes ER α positives à cause de la résistance qui survient chez 30-40% d'entre elles. Parmi les mécanismes proposés, on croit que cette résistance peut être due à plusieurs mécanismes soit à l'activité ligand-indépendante de ER en réponse aux voies de signalisation des protéines kinases, à l'action de E2 indépendamment de ER où E2 génère des métabolites génotoxiques, ou encore à la présence de ER β (114-116). Le traitement alternatif au tamoxifène est celui utilisant l'antagoniste ICI 182,780 dont l'action mène à la dégradation de ER α , mais malheureusement des cas de résistance ont été récemment rapportés. Les inhibiteurs de l'aromatase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse des estrogènes, sont aussi utilisés comme traitement du cancer du sein (117).

Concernant l'isoforme ER β , son rôle dans le développement et la progression du cancer reste encore incertain. En effet, les tentatives pour attribuer une valeur clinique à la présence de ER β au niveau des tumeurs mammaires se sont avérées infructueuses. Cependant, certaines études ont attribué un rôle de suppresseur tumoral à ER β . En effet, dans les cas de surexpression de ER α , la suppression de ER β est souvent une caractéristique de la carcinogenèse du tissu mammaire, ce qui associe la perte de

l'expression de ER β au développement du cancer (118). *In vitro*, l'expression de ER β confère un effet antiprolifératif et augmente l'expression de cycline D, MYC et p53, ce qui a pour effet d'arrêter le cycle cellulaire dans la phase G1 (119, 120). Parmi les mécanismes suggérés dans le but de caractériser l'action de ce récepteur, certains proposent que ER β soit capable de réprimer l'activité transcriptionnelle de ER α ainsi que la transcription des gènes cibles de ER α (121).

1.10. Les chimiokines

Les chimiokines sont des petites protéines de nature basique de poids moléculaires variant entre 8 et 14 kDa. On compte une quarantaine de chimiokines identifiées jusqu'à présent. Leur grand nombre ainsi que leur chevauchement au niveau de la spécificité de leurs récepteurs respectifs, définissent les chimiokines comme le groupe de ligands le plus complexe des GPCR (122, 123). Comme le terme chimiokine n'est qu'un néologisme abrégé de cytokine chimiotactique (124), il serait intéressant de noter le rôle des cytokines. Ce sont des glycoprotéines qui agissent comme des signaux de communication entre les cellules avec un pouvoir régulateur sur presque tous les types cellulaires du corps humain. En effet, les effets des chimiokines sont connus particulièrement sur les systèmes immunitaire, hématopoïétique, endocrinien et le système nerveux (125, 126). Bien que les chimiokines fassent partie de la superfamille des cytokines, ces molécules ont établi leur propre rôle qui se traduit principalement dans la migration des leucocytes pendant les inflammations, et ce à travers la signalisation induite par des récepteurs spécifiques de type GPCR (125, 127).

1.10.1. Structure des chimiokines

La structure des chimiokines est caractérisée par 4 résidus cystéine (C) conservés formant des ponts disulfures entre la première et la troisième et entre la deuxième et la quatrième cystéine qui sont liées entre elles par des ponts de cystéine. C'est en se basant sur la structure des chimiokines que cette famille de protéines a été divisée en quatre groupes et ce en considérant l'arrangement des deux premières cystéines (Figure 9). En effet, le premier groupe qui est classé CXC rassemble les chimiokines dont les deux premières cystéines sont séparées par un acide aminé X. Si aucun acide aminé ne se

trouve entre les cystéines, les chimiokines seront classés dans le groupe CC qui est le deuxième groupe. Le troisième groupe concerne la structure qui fait intervenir 3 acides aminés entre les deux cystéines soit CX3C, ce groupe est particulier puisque certaines chimiokines de type CX3C agissent comme récepteurs de surface, comme c'est le cas pour CXCL16 (128) et CX3CL1 (129). Le dernier groupe consiste en un motif qui se caractérise par seulement deux cystéines à la place de 4, c'est le groupe C. Malgré les différences structurelles voir aussi fonctionnelles des quatre sous-familles des chimiokines, ceux-ci sont tous encodés par le même gène (130).

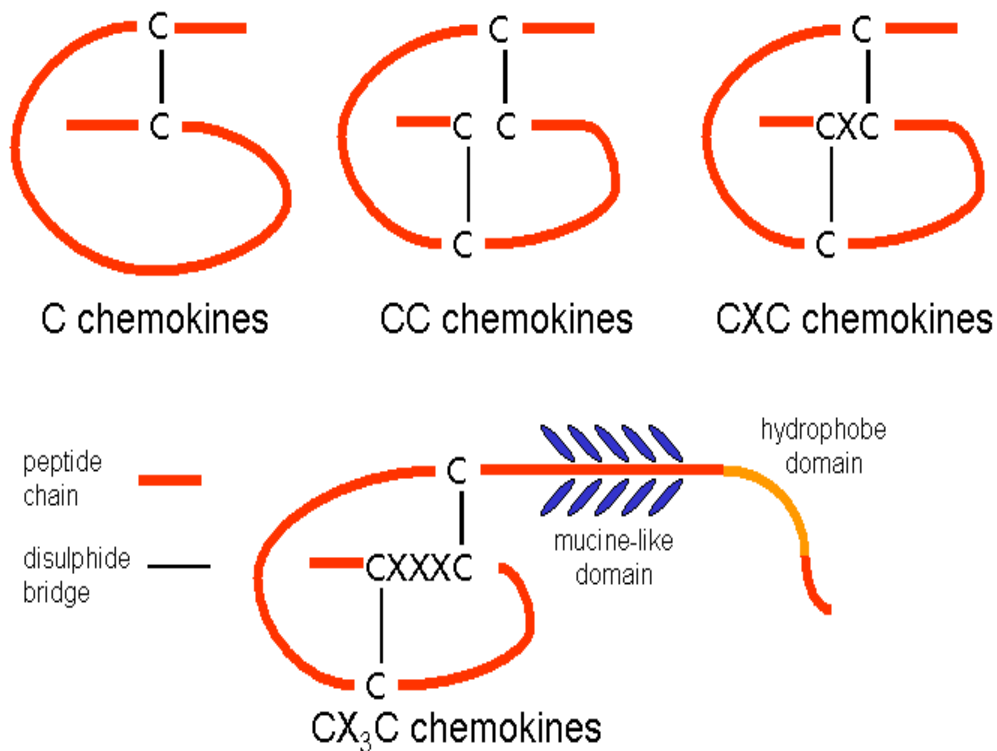


Figure 9 : Configuration des 4 classes de chimiokines.

Les 4 classes sont caractérisées par un motif C, CC, CXC et CX3C, où le C représente un résidu cystéine et X n'importe quel acide aminé. Figure adaptée de (131)

1.10.2. Fonction des chimiokines

Le rôle central des chimiokines ne demeure pas que dans l'extravasation des leucocytes, mais aussi dans leurs interactions avec les cellules hôtes (132). On a aussi démontré que la maturation des lymphocytes T et B requiert plusieurs chimiokines, soit CXCL12, CXCL13 et CCL20 pour les cellules B et CCL2, CCL3 ainsi que CCL5 pour les cellules T (133-135). Quand des cellules expriment les récepteurs des chimiokines, elles deviennent automatiquement des cibles pour la régulation par les chimiokines. En effet, le fait que les cellules dendritiques immatures expriment les récepteurs tel que CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CCR7 et CXCR2, les rend susceptibles à la régulation par les chimiokines. L'interaction entre les chimiokines et leur récepteur se traduit par l'attraction et la localisation de ces cellules dendritiques à l'endroit de l'inflammation (136, 137).

Les chimiokines peuvent aussi agir en concert avec d'autres cytokines pour une synergie dans la modulation de la réponse immunitaire. Effectivement, il a été démontré que chez les souris déficientes en CCL12, les cellules TH2 (Type 2 helper) ne produisent plus adéquatement les interleukines IL-4, IL-5 et IL-10, qui sont importantes dans la réponse immunitaire. Ce dysfonctionnement revient au contrôle qu'exerce CCL12 sur la polarisation des cellules TH2 qui conduit à l'activation de CCL12 pour induire la sécrétion des cytokines. Ce sont les TH2 qui vont par la suite amplifier l'immunité humorale (138).

Les chimiokines de types CXC sont hétérogènes dans leurs actions, notamment au niveau de l'angiogenèse dépendamment si ces chimiokines sont ELR⁺ ou ELR⁻ c'est-à-dire qu'elles possèdent ou non le motif Glu-Leu-Arg dans leurs séquences. Alors que certaines chimiokines, telles que CXCL8, CXCL7, CXCL1 et CXCL12 qui sont ELR⁺ stimulent l'angiogenèse, les chimiokines de type ELR⁻ comme CXCL4, CXCL10, CXCL9, CXCL19 et CXCL21 inhibent plutôt l'angiogenèse (139).

Les différentes fonctions des chimiokines résultent de l'activation de celles-ci après leur interaction respective avec leurs récepteurs, les récepteurs des chimiokines.

1.10.3. La chimiokine CXCL12/SDF-1

La chimiokine CXCL12 a été isolée initialement à partir des cellules stromales de la moelle osseuse de souris, de sorte qu'elle est connue également sous le nom de stromal cell-derived factor 1 ou SDF-1 (122). CXCL12/SDF-1 est une chimiokine très conservée chez les vertébrés inférieurs et supérieurs. SDF-1 est connu pour être exprimé par plusieurs tissus comme le cerveau, le tissu cardiaque, les poumons, le foie et la moelle osseuse, ce qui lui attribue un rôle central dans le développement du système nerveux central, les cellules hématopoïétiques et le système vasculaire aussi dans la mobilité, la prolifération et la survie cellulaire (140). SDF-1 est aussi considérée comme l'un des facteurs chimiotactiques le plus puissant (141). Son potentiel de chimioattraction repose sur l'expression de son récepteur, soit le récepteur CXCR4, particulièrement au niveau des monocytes, qui sont impliqués dans la domiciliation et l'activation des lymphocytes T, les cellules pré-B, les cellules dendritiques et les astrocytes (140, 142). Alors que l'expression de la plupart des chimiokines est induite par les cytokines, SDF-1 est produit de façon constitutive en condition normale (143). Toutefois, certains facteurs peuvent induire l'expression de SDF-1 comme les agents causants des dommages dans l'ADN ou encore ceux impliqués dans l'hypoxie, ou suite à des traitements chimiothérapeutiques contre les différents cancers (144). Il y a deux isoformes de SDF-1, soit SDF-1 α et SDF-1 β , qui partagent la même séquence en acide aminé à l'exception d'une extension de 4 acides aminés dans la région N-terminale de SDF-1 β (143).

L'effet de SDF-1 sur la mobilité cellulaire est aussi utilisé par les cellules cancéreuses, favorisant leur potentiel de migration. En effet, il a été démontré que plusieurs tumeurs produisent SDF-1, ce qui a pour effet de favoriser la croissance de la tumeur ainsi que son pouvoir métastatique au niveau des tissus exprimant un niveau élevé de SDF-1, notamment les poumons, le foie et les ganglions lymphatiques (Figure 10) (145).

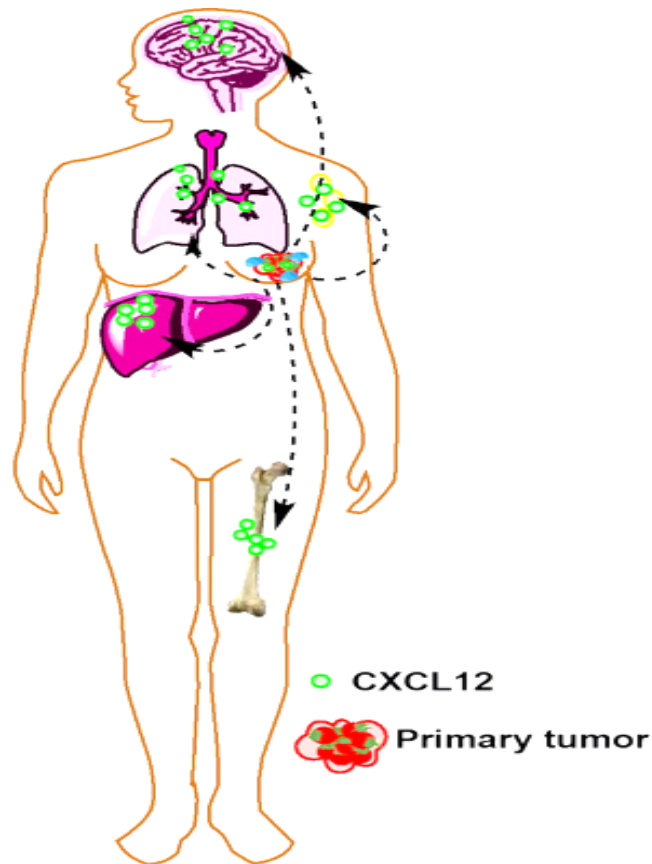


Figure 10 : Effets métastatiques de SDF-1.

Les tissus qui expriment SDF-1 en abondance deviennent des cibles de métastases tumorales. Adaptée de (146)

1.11. Les récepteurs des chimiokines

Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la famille des 7TMRs (Récepteurs à 7 domaines transmembranaires) couplés à la protéine G (GPCR) et sont divisés en quatre groupes en fonctions de la famille à laquelle la chimiokine qui lie le récepteur appartient. Ces 4 groupes sont CXCR, CCR, XCR et CX3CR, où la lettre R désigne le récepteur. À ce jour, 19 récepteurs ont été découverts pour les 40 chimiokines identifiées, soient 10 récepteurs dans la famille CCR, 7 du type CXCR, 1 du type CX3CR et 1 du type XCR (147). Des récepteurs de différentes familles peuvent lier une même chimiokine et inversement un seul récepteur peut lier plusieurs chimiokines, ce qui confère un élément de redondance dans le réseau des chimiokines et leurs récepteurs, tout

en gardant des réponses différentes en signalisation cellulaire (148). Un exemple de cette redondance est la chimiokine CXCL11 qui est un ligand pour les récepteurs CXCR7 et CXC3, ou encore la chimiokine CCL4 qui peut lier CCR1, CCR5 et CCR8 (149)

Les récepteurs des chimiokines partagent plusieurs caractéristiques communes en plus d'avoir une similitude de séquence (122). Le domaine N-terminal des récepteurs, soit celui qui est exposé à l'extérieur de la cellule, est le domaine le moins conservé entre les différents récepteurs, apportant ainsi une spécificité de liaison au ligand. Par contre, c'est à l'intérieur de ce domaine qu'on retrouve des boucles extracellulaires contenant dans leur structure des résidus cystéines hautement conservés, qui sont responsables du changement conformationnel induit par la liaison du ligand. En effet, la cystéine dans la portion N-terminale fait un pont disulfure avec la cystéine de la première boucle extracellulaire, alors que la cystéine de première boucle extracellulaire forme le pont avec la cystéine de la deuxième boucle (Figure 11) (150). Les ponts disulfures vont permettre un repliement favorable du récepteur en vue d'activer le récepteur et déclencher la signalisation cellulaire (151).

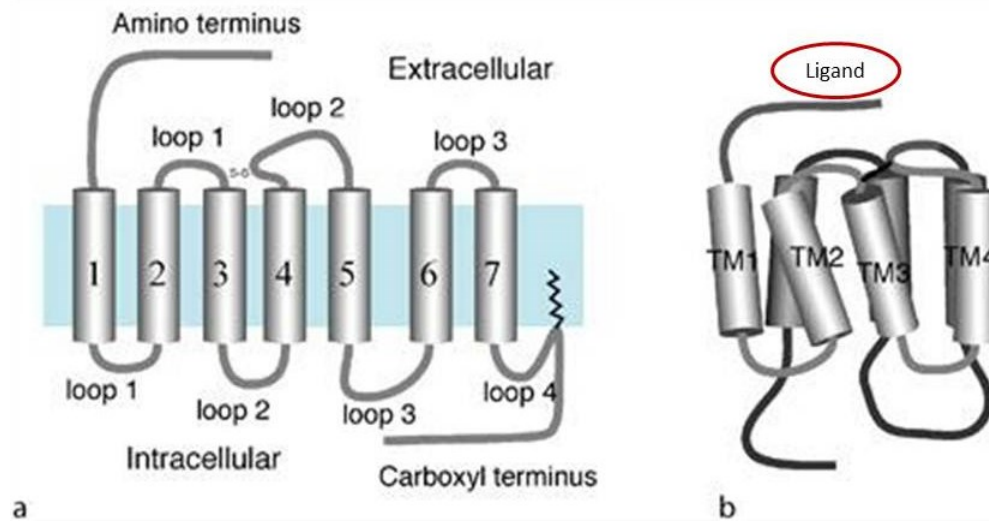


Figure 11 : Structure générale des récepteurs des chimiokines.

En (a), la structure bidimensionnelle du récepteur, et en (b) le récepteur après les changements conformationnels induits par la liaison du ligand. Adaptée de (152).

Alors que le domaine extracellulaire du récepteur lie le ligand, les domaines intracellulaires sont impliqués dans le déclenchement du signal et sa transmission dans la cellule. La signalisation du récepteur passe par son interaction avec la protéine G qui interagit avec le domaine DRYLAI qui est situé dans la seconde boucle intracellulaire du récepteur. DRYLAI est hautement conservé entre les récepteurs des chimiokines et aussi entre les récepteurs des chimiokines et certains GPCR (150).

La régulation des récepteurs des chimiokines est contrôlée par plusieurs mécanismes en fonction des cellules cibles et de la réserve en récepteurs chez les cellules, comme est le cas pour le récepteur CXCR4. La réserve cellulaire en CXCR4 permet une réponse rapide en signalisation cellulaire suite à l'activation de CXCR4 par son ligand (153). Les chimiokines induisent l'internalisation de leurs récepteurs respectifs. Cette internalisation consiste en une modulation du récepteur qui se traduit par l'arrivée des cellules dans le tissu cible. Le phénomène d'endocytose/exocytose ou encore appelé recyclage est aussi un mécanisme de régulation des récepteurs qui régule la quantité des récepteurs présents à la surface cellulaire. Les récepteurs des chimiokines subissent la dégradation par le mécanisme d'internalisation dans le but de réguler un niveau adéquat des récepteurs à la surface de la cellule (150).

1.11.1. Le récepteur CXCR4

Lors de sa découverte, CXCR4 était considéré comme un récepteur orphelin, c'est-à-dire qu'aucun ligand n'avait été identifié. Il portait alors le nom Fusin et était considéré comme un corécepteur du virus HIV-1. Suite à l'identification de la spécificité de ce récepteur à la chimiokine CXCL12/SDF-1, il a été classé dans la catégorie des récepteurs de chimiokine lui attribuant le nom CXCR4 (122).

Le gène codant pour CXCR4 est situé au niveau du chromosome 2, et sa transcription donne une protéine de 352 acides aminés qui une fois activée induit divers signaux qui sont impliqués de près dans le contrôle de plusieurs processus biologiques dont le plus important fait, soit le chimiotactisme des cellules. Outre le chimiotactisme des cellules, CXCR4 est impliqué dans le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire, l'apoptose ainsi que la survie des cellules (122, 154). CXCR4 est largement

exprimé dans différents tissus, comme la moelle osseuse, le thymus, les ganglions lymphatiques, la glande pituitaire (155), et plus spécifiquement au niveau des cellules hématopoïétiques telles que les monocytes, les neutrophiles, les lymphocytes T, les cellules et précellules B, les cellules CD34+, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, ainsi que dans les cellules vasculaires et neuronales (122).

1.11.1.1. Signalisation de CXCR4

Tout comme pour les autres types de GPCR, la signalisation de CXCR4 passe par les protéines G. L'activation de CXCR4 est initiée par la liaison de SDF-1 qui favorise le recrutement de protéine G sous la forme de deux sous unités $G_{\alpha i}$ qui inhibe l'adénylate cyclase et la sous unité $G_{\alpha q}$ qui est impliquée dans la mobilisation du calcium. L'activation de la protéine G est spécifiquement induite par une cystéine située au niveau de la boucle intracellulaire près de la partie C-terminale du récepteur (156). La signalisation par les protéines G régule les différentes voies de phosphorylation impliquant les voies de MAPKs, PI3K/Akt, IP-3 et GRK (G-protein coupled receptor). En particulier, l'activation des kinases MAPKs et PI3K/Akt par CXCR4 régule la survie et la prolifération cellulaire et aussi le chimiotactisme, pendant que l'activation de IP-3 va amplifier la mobilisation du calcium (157). L'internalisation du récepteur est entre autres régulée par le récepteur lui-même. En effet, son internalisation est médiée par β -arrestine, et la modulation de cette dernière, est induite par GRK qui elle-même est activée par CXCR4 (156) (Figure 12). En outre, il semblerait que la β -arrestine est aussi essentielle pour la migration cellulaire (158).

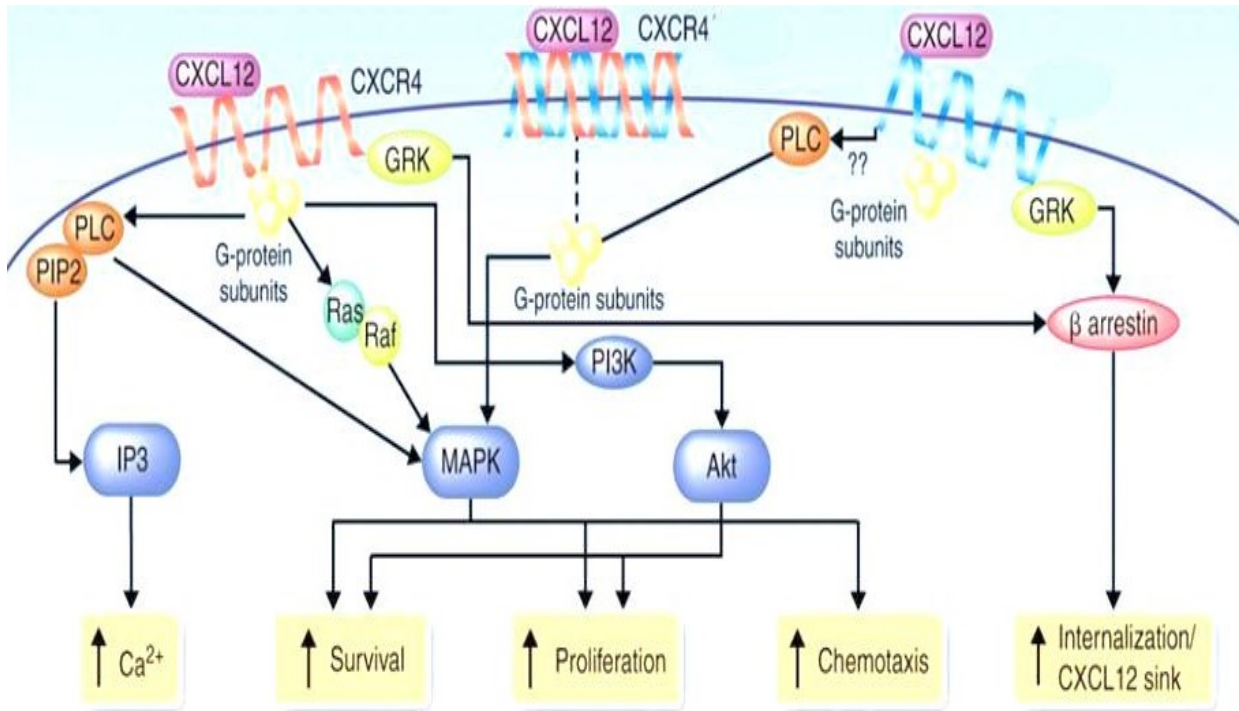


Figure 12 : Signalisation de la voie CXCR4/SDF-1.

Schématisation de l'activation des différentes voies de signalisation suite à l'activation de CXCR4 et au recrutement des protéines G par SDF-1. Adaptée de (157)

1.11.1.2. Rôle de CXCR4

L'interaction de CXCR4 et SDF-1 régule plusieurs processus, et ce, depuis le développement embryonnaire. En effet, le récepteur CXCR4 et sa chimiokine SDF-1 sont fortement exprimés pendant le développement embryonnaire et leur rôle essentiel a été démontré avec les modèles de souris déficientes en CXCR4 ou en SDF-1. Dans les deux cas, il y avait mort *in utero* ou bien dès la naissance, causée par des malformations et un mauvais développement du cerveau, de la valve cardiaque et du septum ventriculaire (122). Ces observations ont permis de démontrer que l'interaction CXCR4/SDF-1, en plus de réguler des mécanismes d'homéostasie, était essentielle au développement du système cardiaque et neuronal, et à la mobilisation au niveau des cellules souches (159).

Malgré les bienfaits de l'axe CXCR4/SDF-1 dans le développement physiologique, il reste que CXCR4 et sa chimiokine sont largement impliqués dans le cancer et sa dissémination à travers le mécanisme complexe de métastase (160). Le

potentiel métastatique s'explique par la relation étroite entre CXCR4 et SDF-1 où SDF-1 est préférentiellement exprimée dans certains tissus, alors que CXCR4 est réparti au niveau des tissus répondants à un gradient de concentration de SDF-1, comme indiqué à la figure 10. L'expression de CXCR4 est induite par HIF- α (Hypoxia inducible factor-1 α), un facteur de transcription induit dans les cellules tumorales. L'expression de SDF-1 à son tour stimule l'expression des métalloprotéases pour ainsi favoriser l'invasion tumorale (159).

1.12. CXCR4 et SDF-1 dans le cancer du sein

Plusieurs études ont démontré le rôle des cellules souches dans le développement de certains types de cancer comme le cancer du sein et le cancer de la prostate (161-163). CXCR4 est exprimé dans les cellules souches de différents tissus, apportant une corrélation entre son expression et le potentiel de carcinogenèse (155). Les recherches sur le cancer du sein ont mis en évidence que les tissus cancéreux exprimaient un taux élevé de CXCR4 comparativement aux tissus sains (164). En effet, l'augmentation de CXCR4 dans le cancer du sein est générée par des niveaux élevés de VEGF (vascular endothelial growth factor) et l'activation de NF- κ B (nuclear factor kappa B) (165, 166). L'expression de CXCR4 au niveau du cancer du sein et son interaction avec SDF-1 est considérée comme l'axe principal de la propagation des métastases dans les tissus cibles comme les poumons, le foie et la moelle osseuse (Figure 13) (164).

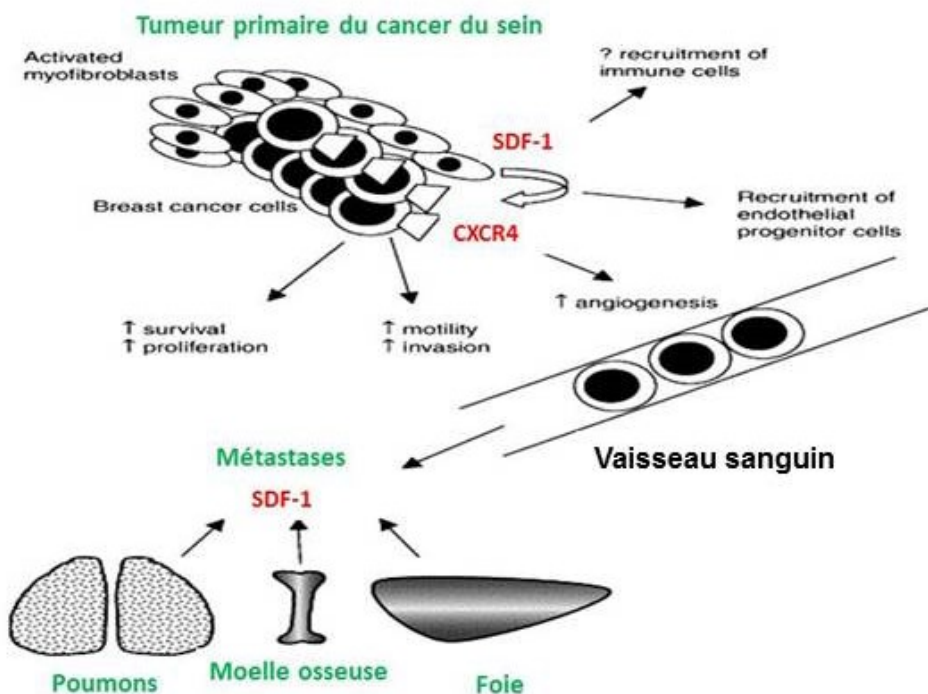


Figure 13 : L'effet métastatique de SDF-1 et CXCR4 dans le cancer du sein.

Dans une tumeur primaire du cancer du sein, SDF-1 interagit avec CXCR4 et active plusieurs voies, dont l'angiogenèse, qui va par la suite inciter à la sécrétion de SDF-1 par les poumons, la moelle osseuse et le foie. L'effet chimiotactique entre CXCR4 dans la tumeur primaire et SDF-1 dans les poumons, la moelle osseuse et le foie, entraîne la migration des cellules cancéreuses au niveau de ces organes. Adaptée de (167)

Cependant, la régulation de l'expression et du rôle pathogène de CXCR4 ne sont pas encore très bien connus et le mécanisme qui régit l'expression de CXCR4 avant le déclenchement des métastases du cancer du sein reste inconnu. L'effet pathologique des œstrogènes dans le tissu mammaire peut expliquer en partie le mécanisme responsable de la propagation du cancer suite au lien établi entre les chimiokines et les récepteurs des œstrogènes. En effet, les œstrogènes provoquent l'expression du gène codant pour la chimiokine SDF-1 par le récepteur des œstrogènes $ER\alpha$, tel que démontré dans les cellules cancéreuse du sein et des ovaires (168). Pour ajouter à ce mécanisme de régulation, nous avons récemment identifié au laboratoire, l'existence d'une boucle de régulation autocrine-paracrine entre l'axe CXCR4/SDF-1 et les récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$ (101). En

effet, l'activation hormonale des ERs par l'estrogène induit la transcription des gènes cibles dont SDF-1, qui va interagir avec CXCR4 à la surface pour induire l'activation de la voie MAPK, qui elle va provoquer l'activation transcriptionnelle de ER α et ER β . Cette boucle d'autorégulation positive vise à favoriser la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses (Figure 14) (101).

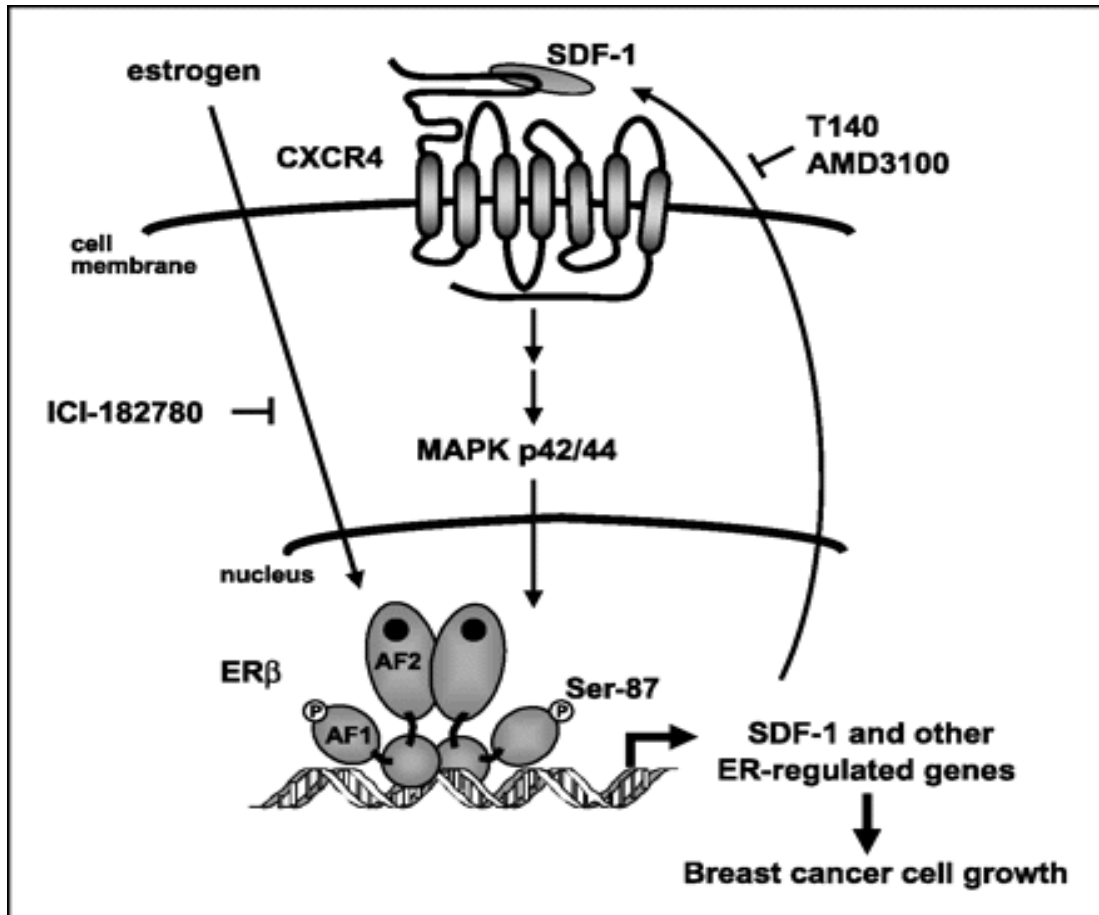


Figure 14 : Représentation de la boucle de régulation entre ER et CXCR4/SDF-1.

L'Activation des ERs par E2 induit la transcription des gènes, dont SDF-1 qui à son tour lie CXCR4 et active MAPK. Cette dernière, phosphoryle la Serine-87 dans le domaine AF-1 ce qui activera davantage le récepteur. Adaptée de (101)

2. Hypothèse et objectifs

L'identification récente de SDF-1 (stromal-cell derived factor 1), le ligand physiologique du récepteur CXCR4 comme régulateur positif de l'activité de ER α et ER β par notre laboratoire (101), nous a permis de déterminer et caractériser une boucle autocrine/paracrine de régulation entre CXCR4 et ER α/β conduisant à une augmentation de gènes cibles prolifératifs, tels que cMyc, cyclinD1, PgR et SDF-1 lui-même. Les mécanismes exacts de cette régulation restent inconnus au niveau du contrôle transcriptionnel de ces gènes par la chimiokine SDF-1. Pour ajouter à cette régulation oncogénique, une régulation hormonale du gène du récepteur CXCR4 par les récepteurs des estrogènes est également considérée dans les cellules cancéreuses

L'hypothèse de recherche est que l'implication de ER β dans la régulation de CXCR4 est médiée par la phosphorylation de la sérine 87. L'objectif principal du projet étant de caractériser le mécanisme de cette régulation dans une lignée cancéreuse du sein.

Les objectifs spécifiques sont 1- de développer un modèle cellulaire permettant de discriminer le rôle respectif de ER α et ER β , et 2- procéder à une analyse ChIP des éléments de liaison pour le promoteur CXCR4 au niveau de l'ADN.

Afin d'identifier les mécanismes de régulation transcriptionnelle de ER α et ER β par la chimiokine SDF-1 et d'identifier l'une des cibles exactes au niveau génomique de cette régulation, nous proposons d'étudier une région promotrice de CXCR4 un sur le génome humain contenant les éléments de liaison de ER.

3. Matériels et méthodes

3.1. Vecteurs d'expression et clonage moléculaire

Les plasmides d'expression pcDNA contenant la cassette de résistance à la néomycine et codant pour ER α et ER β humain, ainsi que le rapporteur de luciférase ERE₃tkLuc ont été décrits précédemment (49). La mutation ponctuelle du résidu serine-87 de ER β en alanine a été générée par mutagenèse dirigée par PCR avec les amorces hER β -S87A-F et hER β -S87A-R (Tableau 1) à partir de plasmide pcDNA-hER β en utilisant la polymérase Pwo (169). La mutation a été confirmée par digestion avec SpeI et séquençage automatique.

Un fragment du promoteur du gène de CXCR4 correspondant à une longueur de 1100 pb, a été amplifié par PCR avec les amorces hCXCR4prom-start et hCXCR4prom-stop (Tableau 1) à partir de l'ADN génomique des cellules humaines THP-1. Les amorces ont été conçues avec le logiciel MacVector et les sites de restriction Sall (amorce start) et BamHI (amorce stop) ont été ajoutés aux extrémités des amorces. Le produit de PCR a été digéré avec BamHI et Sall puis inséré dans le plasmide bLuc qui contient le gène de la luciférase.

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par PCR et mutagenèse par PCR

Gène	Amorces	Taille du produit
hERβ-S87A	F : CACTAGTGGAGCAAGGTGCC	1490 bp
	R : GGCACCTTGCTCCACTAGTG	
Prom-CXC4	Start : TGGAGAACAAGGTGATCTGCG	1100 bp
	Stop : CGAAACAGCAGCCCTTATTTGC	

3.2. Culture cellulaire

Les cellules humaines MDA-MB-231 proviennent d'un carcinome du sein. Elles sont ER- mais CXCR4+. Les cellules ont été cultivées dans des pétris de 100 mm dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma) avec 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) et antibiotiques: pénicilline/streptomycine 0.5% (Invitrogen). Les cellules 293 qui proviennent d'un rein embryonnaire humain mâle (non cancéreuses) sont aussi ER-. Elles ont été maintenues dans un milieu DMEM avec 5% de FBS et antibiotique. L'incubation des cellules se faisait à 37 °C dans un incubateur contenant 5% de CO₂. Le milieu était changé aux deux jours. Pour les essais qui nécessitaient le traitement à E2 notamment les essais de luciférase, et les analyses de qRT-PCR et CHIP, les cellules ont été mises en culture dans un milieu DMEM sans rouge de phénol avec 10% de FBS préalablement traité avec du dextran T75 et du charbon activé, pour éliminer toutes traces de stéroïdes et hormones pouvant interférer avec les ERs.

3.3. Transfection transitoire et essai luciférase

Pour la transfection transitoire, les cellules ont été cultivées dans des plaques de 24 puits dans un milieu DMEM 5% FBS sans le rouge de phénol, puis les plasmides ont été introduits en utilisant la méthode calcium phosphate pour les cellules 293T comme décrit précédemment (170), alors que pour les cellules MDA-MB-231. Les plasmides ont été introduit avec la méthode de transfection au PEI (polyéthylèneimine) avec un rapport ADN : PEI équivalent à 1 : 6, puis le volume final de la solution de transfection et complété à 100uL avec du milieu de culture sans FBS. Par la suite le mélange est incubé 15min à température pièce avant de le déposer dans les puits. Pour les deux types de cellules et à la confluence 50-60%, 1µg d'ADN a été utilisé pour transfecter chaque puits qui contient 500ng de plasmide rapporteur, 100ng du vecteur exprimant le récepteur, 250ng de CMX-β-gal et 250ng de plasmide pKS. Après 6h d'incubation, le milieu a été changé et les cellules ont été traitées pour 16h ou non avec 10nM d'estradiol (E2 : Sigma) ou 25nM de SDF-1 (Cell Sciences). Pour l'essai luciférase, les cellules ont été lysées dans un tampon phosphate potassium contenant 1% Triton X-100 et la lumière émise a été mesurée par un luminomètre (Wallac) après l'ajout de la luciférine. Les essais

luciférase ont été effectués en triplicata pour trois expériences indépendantes, et les valeurs sont exprimées en unités relatives de lumière normalisée à l'activité de β -galactosidase de chaque échantillon.

3.4. Western blot

Les cellules sont d'abord lavées avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline) et les culots sont par la suite récupérés pour être lysées dans un tampon RIPA contenant 0,5% d'acide désoxycholique, 1% de NP-40, 0,1% de SDS (dodécylsulfate), 1mM de PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyle), 5 mM de NaF (fluorure de sodium), 2 mM de Na_3VO_4 (orthovanadate de sodium), 150 mM de NaCl (chlorure de sodium) et des inhibiteurs de protéase (169) dans du PBS. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert à 200V. Pour bloquer les sites de liaison non spécifiques, la membrane a été incubée 1h avec un réactif de blocage (169) dans le TBS. Puis, la membrane est incubée avec un anticorps de lapin anti ER α (1:500) ou anti ER β (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) o/n à 4°C ou avec un anticorps anti β -actine (1:1000, anticorps de souris; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La membrane est ensuite incubée 1h à T° pièce avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase anti-IgG de lapin (1:10000, anticorps de chèvre; Bio-Rad) ou un anticorps anti IgG de souris couplé à la peroxydase (1:10000, anticorps de chèvre; Sigma) respectivement. La révélation des signaux a été visualisée sur des films d'autoradiographie en utilisant la solution de révélation ECL (169).

3.5. Extraction d'ARN et qPCR

L'ARN a été extrait par la méthode de TRizol (Invitrogen), puis 1 μ g a été utilisé pour la synthèse des ADNc avec le kit RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). L'ADN complémentaire a été préparé à partir des cellules MDA-MB-231 qui expriment stablement ER α ou ER β ou ER β -S87A. 5 μ l d'ADNc dilué 10x ont été utilisés pour chaque réaction de PCR en temps réel en utilisant les amorces spécifiques pour chaque gène (Tableau 2). Le niveau d'expression de l'ARNm a été évalué en utilisant le Fast SYBR® Green Master Mix (Life technologies) selon le cycle: 95°C pendant 20 secondes, 95°C pour 3 secondes, 40 cycles de 95°C/30 sec, 60°C/30 sec et 72°C/45 sec.

La courbe de fusion est faite durant 60 cycles avec une augmentation de 0.5°C/cycle. Les résultats sont normalisés par rapport au 36B4 qui est un gène de référence codant pour une phosphoprotéine ribosomale acide P0 (RPLP0) (171), puis analysés en utilisant la méthode du $1/2\Delta Ct$ où $\Delta Ct = Ct \text{ du gène} - Ct \text{ 36B4}$. Les expériences sont effectuées en triplicata.

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par qPCR

Gène	Amorces	Taille du produit
PR	GAGGCAAAAAGGAGTTGTGTG	216 bp
	AAGAGAAGGGGTTTCACCATCC	
pS2	TGGAGAACAAGGTGATCTGCG	98 bp
	CGAAACAGCAGCCCTTATTTGC	
SDF-1	CTGCTTACCCGCAAAAAGACAAG	94 bp
	CAGAGGCAATCACAAAACCAG	
CXCR4	CCGCTAACCGGCATACGACATG	100 pb
	GCAGATGCCATCACATGTCCAG	

3.6. Génération de clones stables MDA-MB-231-ER

Les cellules cancéreuses ER-négatives MDA-MB-231 ont été maintenues dans du DMEM contenant 10% de FBS et transfectées au PEI, avec les plasmides pcDNA-hER α ou pcDNA-hER β ou pcDNA-hER β -S87A. Les clones résistants ont été isolés en présence de G418 0,6 mg/mL (Invitrogen) pour générer les lignées cellulaires stables 231-ER α , 231-ER β et 231-S87A respectivement. Les clones stables ont été validés pour leur expression respective de ER α , ER β et ER β -S87A par analyses de Western blot et leur

activité transcriptionnelle en réponse à E2 a été vérifiée par essais luciférase comparativement aux 231-vides (clones stables transfectés avec pcDNA) et enfin la transcription génique a été vérifiée par qPCR sur certains gènes cibles de ER.

3.7. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les cellules stables 231-ER α , 231-ER β et 231-S87A ont été cultivées dans des pétris de 100mm contenant un milieu DMEM sans le rouge de phénol rouge avec un supplément de FBS 5% traité, jusqu'à 90% de confluence puis incubées avec 10nM d'E2 (Sigma) ou 25nM de SDF-1 (Cell Sciences) pendant 40 min. Les complexes protéines-ADN sont cross-linkés avec du formaldéhyde 1% pendant 15min puis rincés 2 fois avec du PBS et le culot a été collecté par centrifugation 5min à 2800 rpm à 4°C. Les cellules sont par la suite lysées dans un tampon de lyse SDS (50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA et 1% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases PMSF 0.1 mM et PIC (Protein Inhibitor Cocktail, Complete-mini, Roche Diagnostics) pendant 10min sur glace, et la chromatine a été soniquée 6x10 sec à puissance 35% (Branson Sonifier) pour obtenir des fragments d'environ 700 pb, puis centrifugée 10min à 13K à 4°C. 10% de la solution est mis de côté en tant que contrôle interne (InPut) et le reste est incubé avec des billes d'agarose couplées à des protéines A pendant 1h à 4°C avec rotation pour bloquer les sites non spécifiques. Les complexes ADN-ER sont ensuite immunoprecipités à l'aide d'anticorps anti ER α ou ER β (Santa Cruz Biotechnology) et billes d'agarose à 4°C. Après lavage, les complexes sont élués 15 min à T° pièce et le cross-link est renversé et l'ADN extrait au phénol/chloroforme et précipité. L'analyse de l'ADN par qPCR est faite avec les amorces spécifiques englobant les EREs des promoteurs cibles PR et CXCR4 (Tableau 3). Les résultats de l'amplification par qPCR ont été analysés avec la méthode du 1/2 $\Delta\Delta$ Ct où $\Delta\Delta$ Ct= (Ct IP- Ct Input) en utilisant Fast SYBR® Green Master Mix (Life technologies) en suivant le programme tel que décrit ci-dessus. Les expériences ont été faites en triplicata.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées ainsi que la taille attendue des produits lors des amplifications par qPCR

Gène	Amorces	Taille du produit
ERE PR	AAGCCCTCCTCCTCCTTAACC	102 bp
	AGCCAGGGTAGCATCGAC	
ERE CXCR4	TTCCCCGAAGTGCCAACAAC	110 bp
	ATGGAGATTCTGGAGACCACC	

3.8. Prolifération cellulaire

Les cellules 231 exprimant stablement ER en comparaison avec les 231-vides ont été maintenues dans le DMEM sans rouge de phénol supplémenté de 2% de FBS traité dans des plaques de 12 puits et ce pendant 4 jours en partant d'une très faible confluence. Les cellules ont été traitées ou non avec E2 10nM ou SDF-1 25nM au jour 1, le traitement a été rafraîchi à tous les jours. La prolifération cellulaire a été mesurée en utilisant le réactif MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma). Les mesures ont été effectuées sur le triplicata de chaque échantillon et l'expérience a été répétée trois fois.

4. Résultats

4.1. L'activité transcriptionnelle des ERs répond à l'estrogène

Pour distinguer le rôle de chaque isoforme de ER de façon indépendante dans la régulation par les chimiokines, nous avons généré des clones MDA-MB-231 humains de cancer du sein qui expriment stablement l'isoforme ER α ou ER β . La lignée stable pour le mutant ER β -S87A a également été développée pour valider le rôle de la phosphorylation de la sérine-87 dans la régulation de ER β par les chimiokines. Comme contrôle négatif, nous avons généré la lignée parentale négative pour ER (231-vide). Pour ce faire, le plasmide pcDNA codant pour ER α , ER β ou ER β -S87A, et contenant le gène de résistance à la néomycine, a été introduit dans les cellules MDA-MB-231. L'antibiotique G418 est ajouté au milieu de culture pour sélectionner les clones positifs, appelés respectivement 231-ER α , 231-ER β et 231-ER β -S87A. 12 clones de chaque transfection ont été isolés et maintenus en culture en présence de G418 0,6 mg/mL. La validation fonctionnelle des 12 clones sélectionnés et ayant acquis la résistance au G418 s'est faite par essai luciférase. On a donc transfecté les clones stables 231-ER α , 231-ER β , 231-S87A et 231-vide de façon transitoire avec le vecteur rapporteur du gène de luciférase ERE₃tkLuc pour déterminer le niveau d'activité luciférase en réponse au ligand physiologique des ERs soit l'estradiol (E2). Les résultats obtenus et présentés à la figure 15 montrent une augmentation de l'activité luciférase en réponse à E2 dans trois clones 231-ER α (numéro 1, 7 et 12), deux clones 231-ER β (numéro 1 et 7) et deux clones 231-S87A (numéro 2 et 10). Pour les lignées 231-vides et tel qu'attendu, aucun des 12 clones ne montre une augmentation de l'activité luciférase en réponse à E2 (Figure 15). Le fait qu'aucun des clones n'a été positif à la réponse à l'œstradiol dans les cellules 231-vides nous rassure d'avoir un contrôle négatif pour la régulation par les récepteurs des estrogènes, et de plus ce contrôle a été généré dans les mêmes conditions que les 231-

ER+. Les essais luciférase nous démontrent l'efficacité des systèmes ERE-ER α , ERE-ER β et ERE-ER β -S87A dans les lignées générées.

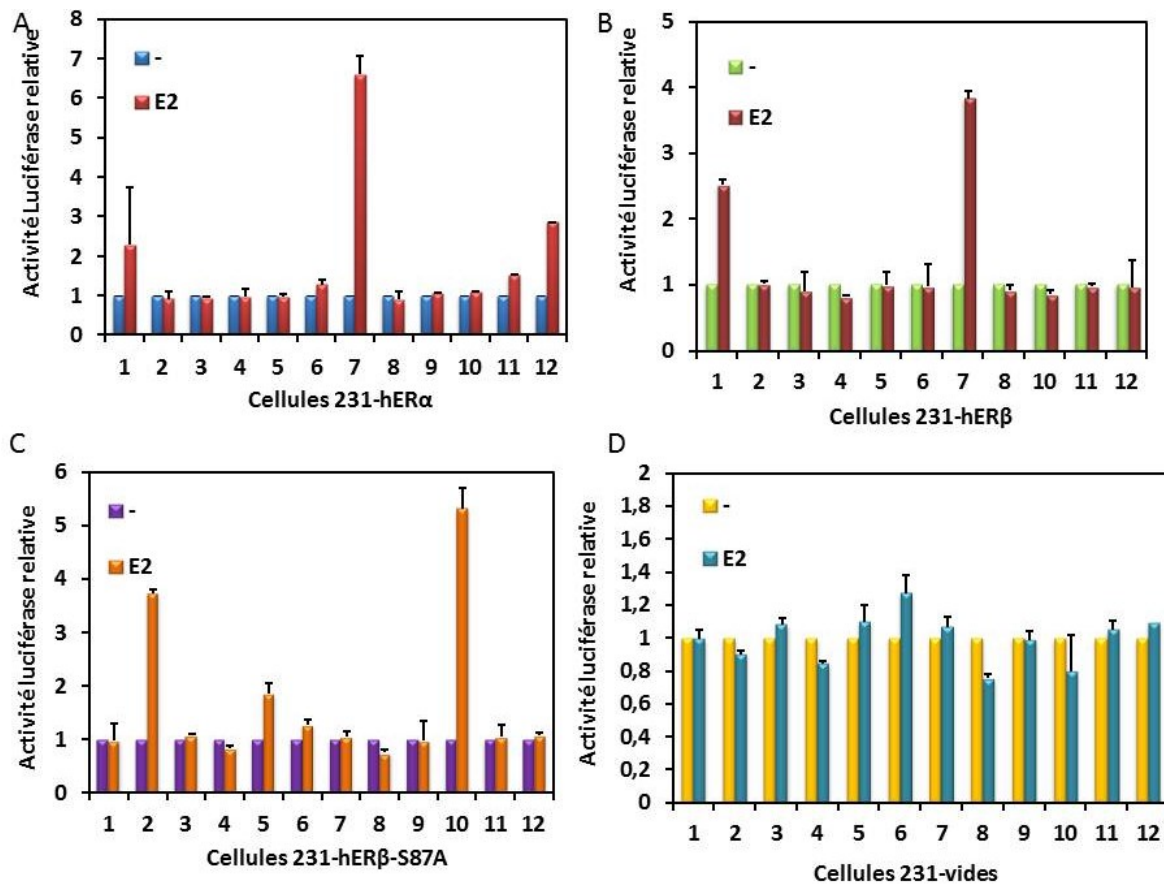


Figure 15 : L'estrogène induit l'activation des ERs.

E2 induit l'activité de : ER α (A), ER β (B) et ER β -S87A (C) dans les lignées stables MDA-MB-231. Les cellules ont été transfectées avec le vecteur rapporteur ERE₃bLuc et traitées avec 10 nM de E2 pendant 16h pour mesurer l'activité luciférase. Les valeurs obtenues sont normalisées avec l'activité β -galactosidase et exprimées en activité luciférase relative. Les lignées 231-vides (D) ont été traitées de façon identique. Les barres d'erreur représentent la moyenne en triplicata de trois expériences indépendantes.

4.2. ERs régulent la transcription des gènes cibles

Par la suite, nous avons procédé à la validation fonctionnelle des clones stables sélectionnés selon leur réponse significative à l'estrogène tel que déterminé par essai luciférase. En effet, il est connu que les isoformes ER α et ER β partagent une variété de gènes cibles de façon similaire, ce qui est dû à leur similarité : (i) de structure, (ii) de reconnaissance des éléments ERE et (iii) d'affinité de liaison avec l'œstradiol. Dans notre laboratoire, nous avons identifié les gènes PR, pS2/ TFF1 (Trefoil factor 1) et SDF-1 comme cibles de ER α et ER β dans des systèmes cellulaires de cancer du sein comme la lignée MCF-7 (101). Dans le but de valider d'un point de vue fonctionnel notre sélection clonale des lignées qui expriment stablement ER α ou ER β ou le mutant S87A, on a déterminé l'expression des gènes PR, pS2 et SDF-1 en réponse à l'estrogène par qPCR. Les résultats obtenus (Figure 16) démontrent une réponse positive des lignées sélectionnées. En effet, le traitement à E2 stimule l'expression de l'ARNm des gènes cibles dans les trois lignées stables par les ER α , ER β , et le mutant ER β -S87A, avec respectivement des augmentations d'expression du gène pS2 de l'ordre de 5.8, 2 et 4.3 fois par rapport aux cellules non traitées (Figure 16A). De même, le gène pour PR (Figure 16B) et pour SDF-1 (Figure 16C) est également régulé à la hausse dans les trois lignées stables en réponse à E2. Cependant, il est à noter que l'augmentation du gène SDF-1 est moins forte dans la lignée du mutant S87A (1.5 fois), suggérant un rôle de Ser-87 dans la régulation de SDF-1 par ER β (Figure 16C).

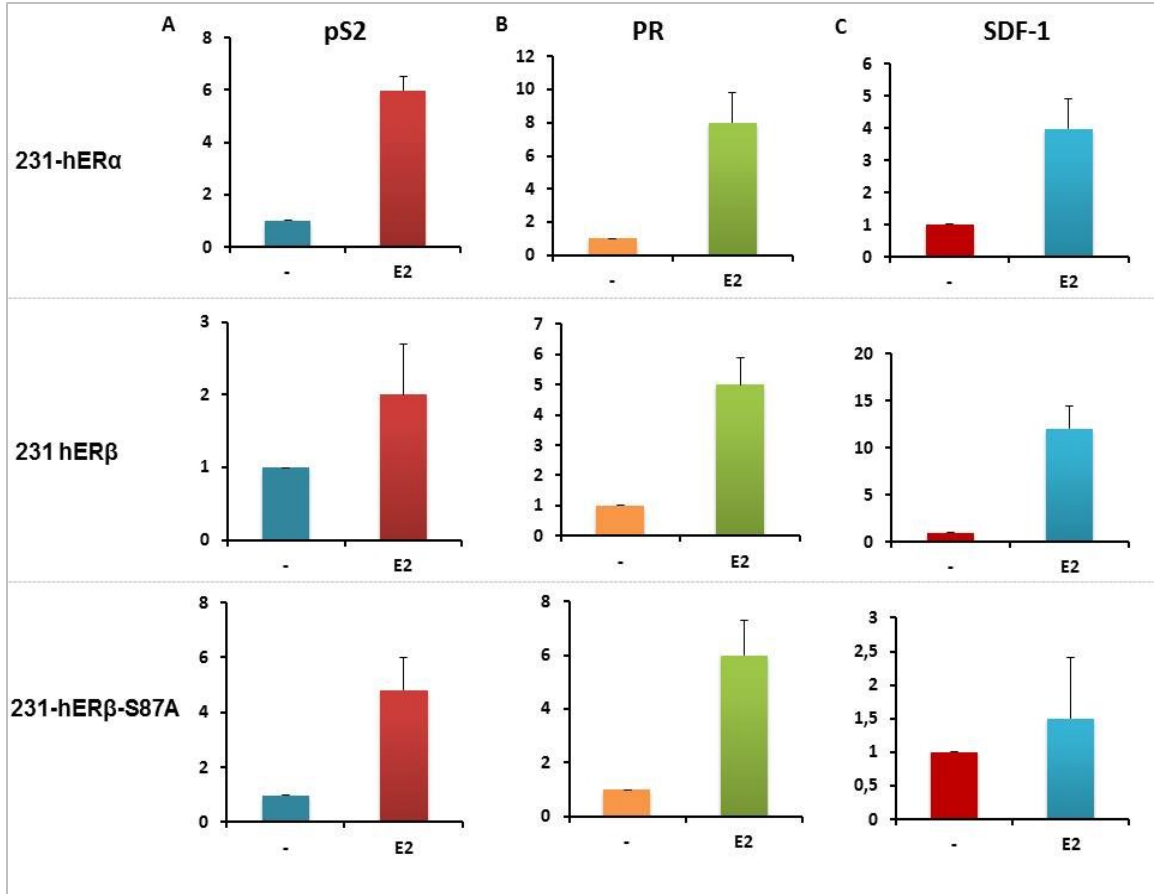


Figure 16 : Analyse des gènes cibles des ERs par qPCR.

L'expression de l'ARNm de pS2 (A), PR (B) et SDF-1 (C) dans les lignées stables 231-ER α , 231-ER β et 231-ER β -S87A a été analysée par q-RT-PCR. Les cellules ont été traitées ou non avec 10nM d'E2 pendant 20 heures. Une réaction de qPCR a été effectuée à partir de 400 ng d'ARN extrait de chaque échantillon en utilisant les amorces spécifiques des gènes PR, PS2 et SDF-1. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de 3 expériences différentes. Test t de Student: * p<0.05, ** p<0.01.

4.3. ER est exprimé stablement dans les lignées 231

La transfection stable du pcDNA-ER α , ER β et S87A dans la lignée MDA-MB-231 nous a permis de sélectionner des clones stables pour chaque ER qui ont été validés par essai luciférase et capables d'induire une régulation positive de l'expression des gènes

cibles en réponse à E2. Les lignées sélectionnées ont été par la suite analysées par Western blot pour la présence de ER α et ER β . Dans les expériences initiales, les cellules ont été mises en culture dans un milieu DMEM complet contenant 10 % FBS, puis testées par Western blot avec comme contrôle positif des lignées 293T transfectées transitoirement avec les différents plasmides pcDNA-ER. Dans ces conditions, il nous a été impossible de détecter ER par analyse Western dans les lignées stables. Nous avons associé cette difficulté au fait que le rouge de phénol dans le milieu DMEM favorisent l'activation de ER, en mimiquant l'effet des estrogènes par complémentarité de structure (172). De plus, certains facteurs de croissance contenus dans le FBS non traité peuvent également contribuer à activer les ERs. Ces deux effets combinés mènent donc à la dégradation des récepteurs puisqu'il est connu que l'activation de ER est associée étroitement à sa dégradation dans une réponse estrogénique (173). Pour pallier à ces effets, nous avons modifié les conditions de culture en utilisant du DMEM en absence de rouge de phénol et du FBS traité au dextran et charbon activé suivi d'une dénaturation par la chaleur afin d'éliminer toute trace d'activité estrogénique. Nous avons également traité les cellules au MG132, un inhibiteur du système ubiquitine-protéasome, qui bloque la dégradation de ER (30, 99). Ces conditions nous ont permis de détecter la présence respective de ER α et ER β par Western Blot dans la lignée stable 231-ER α (Figure 17A), 231-ER β (Figure 17B) et aussi dans la lignée du mutant 231-ER β -S87A (Figure 17C).

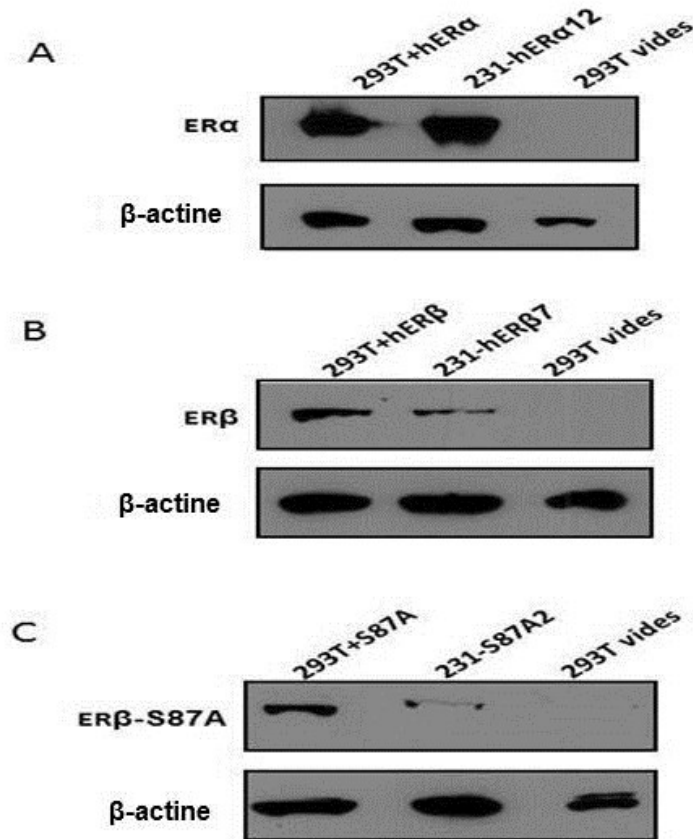


Figure 17 : Niveau de ER α et ER β dans les lignées stables MDA-MB-231.

Les clones positifs ont été sélectionnés avec G418 et leur contenu en ER α (A) et ER β (B) et ER β -S87A (C) a été déterminé par Western blot en chargeant 30 μ g de chacun des trois échantillons protéiques. Les cellules 293T transfectées transitoirement avec les pcDNA-ER respectifs ont été utilisées comme contrôle positif, et les 293T non transfectées en tant que contrôle négatif.

4.4. E2 et SDF-1 induisent la prolifération cellulaire des lignées stables 231-ER

Pour déterminer la croissance des cellules cancéreuses du sein ainsi que l'effet du traitement avec E2 et SDF-1 sur les cellules contenant ou non ER, on a procédé à un essai de prolifération cellulaire. Chacune des lignées stables de ER α /ER β a été traitée avec E2 ou SDF-1 pour chacun des triplicatas de l'expérience. Les réponses de croissance

cellulaire ont été comparées aux cellules non traitées. La lignée 231-vidé a également été testée comme contrôle négatif aux récepteurs. Les mesures de prolifération ont été prises à l'aide de la méthode utilisant le MTT telle que décrite précédemment (30). Les résultats démontrent que le traitement à E2 provoque une augmentation significative dans la croissance cellulaire des lignées 231-ER α et 231-ER β comparativement aux cellules non traitées (Figure 18A et B). On observe également une augmentation, mais moins prononcée pour la lignée 231-ER β -S87A, comparativement aux augmentations observées avec ER α et ER β (Figure 18C). Comme attendu, le contrôle négatif ER-, soit les 231-vidés prolifèrent de façon similaire qu'elles soient traitées ou non à E2 (Figure 18D).

Des travaux au laboratoire ont permis de démontrer que la chimiokine SDF-1 induit une réponse positive sur le potentiel transcriptionnel de ER α et ER β (101). Dans le but de déterminer l'impact de cette contribution sur la croissance cellulaire, nous avons mesuré la prolifération des lignées 231-ER en réponse à SDF-1. On remarque que les lignées qui expriment stablement ER α ou ER β sont plus sensibles à la stimulation par SDF-1, comparativement aux cellules non traitées (Figure 19A, 19B). De plus, la réponse à SDF-1 de la lignée mutante 231-ER β -S87A semble être perdue comparativement au type sauvage ER β (Figure 19C), suggérant un rôle de la sérine-87 dans la prolifération cellulaire dépendante de l'isoforme ER β . La lignée contrôle 231-vidé ne présente aucun effet prolifératif de SDF-1, démontrant l'importance des ERs à soutenir la croissance cellulaire par SDF-1 (Figure 19D),

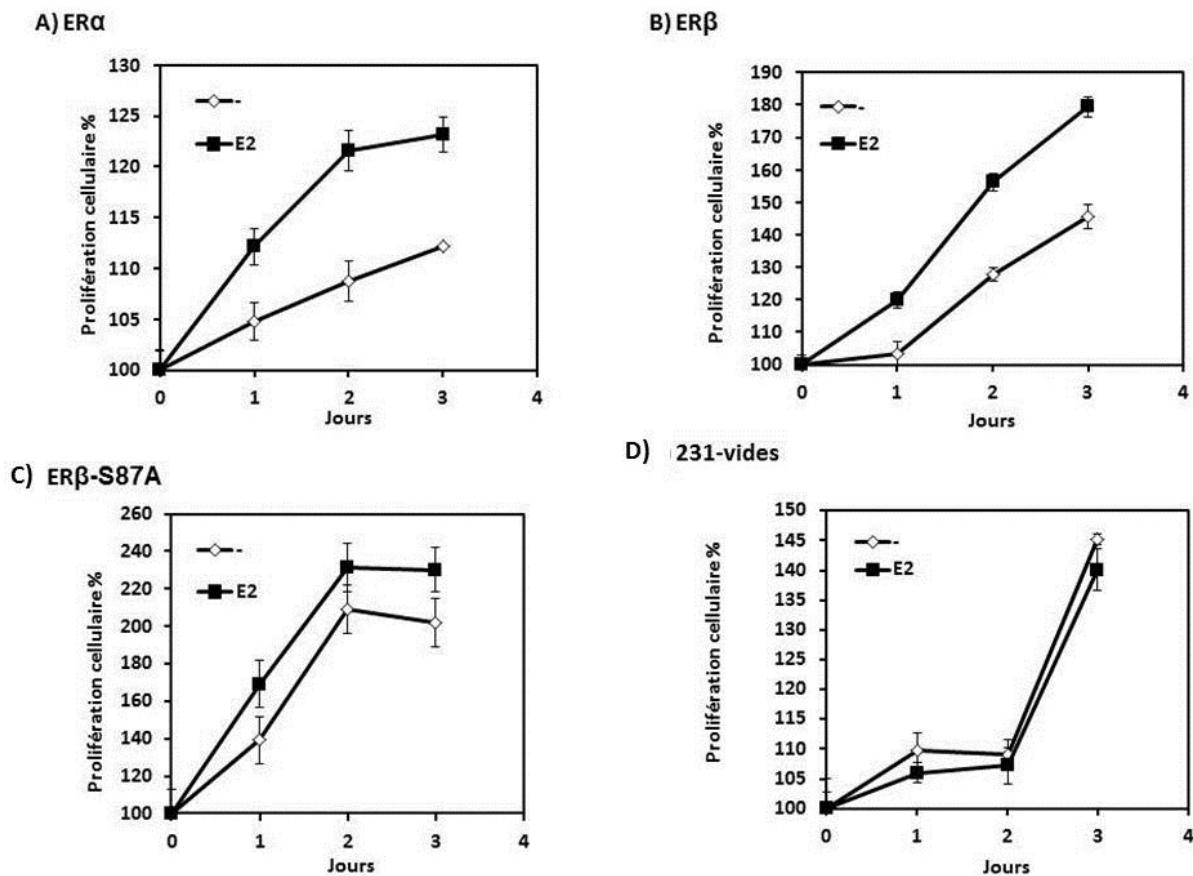


Figure 18 : Prolifération cellulaire des cellules cancéreuses 231 en réponse à E2.

Les lignées 231-ER α (A), 231-ER β (B), 231-ER β -S87A (C) et 231-vides (D) ont été traitées ou non avec 10nM d'estradiol sur une durée de 4 jours, et les mesures de croissance ont été déterminées par la méthode utilisant le MTT. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de 3 expériences différentes. Test t de Student: *p<0.05, ** p<0.01.

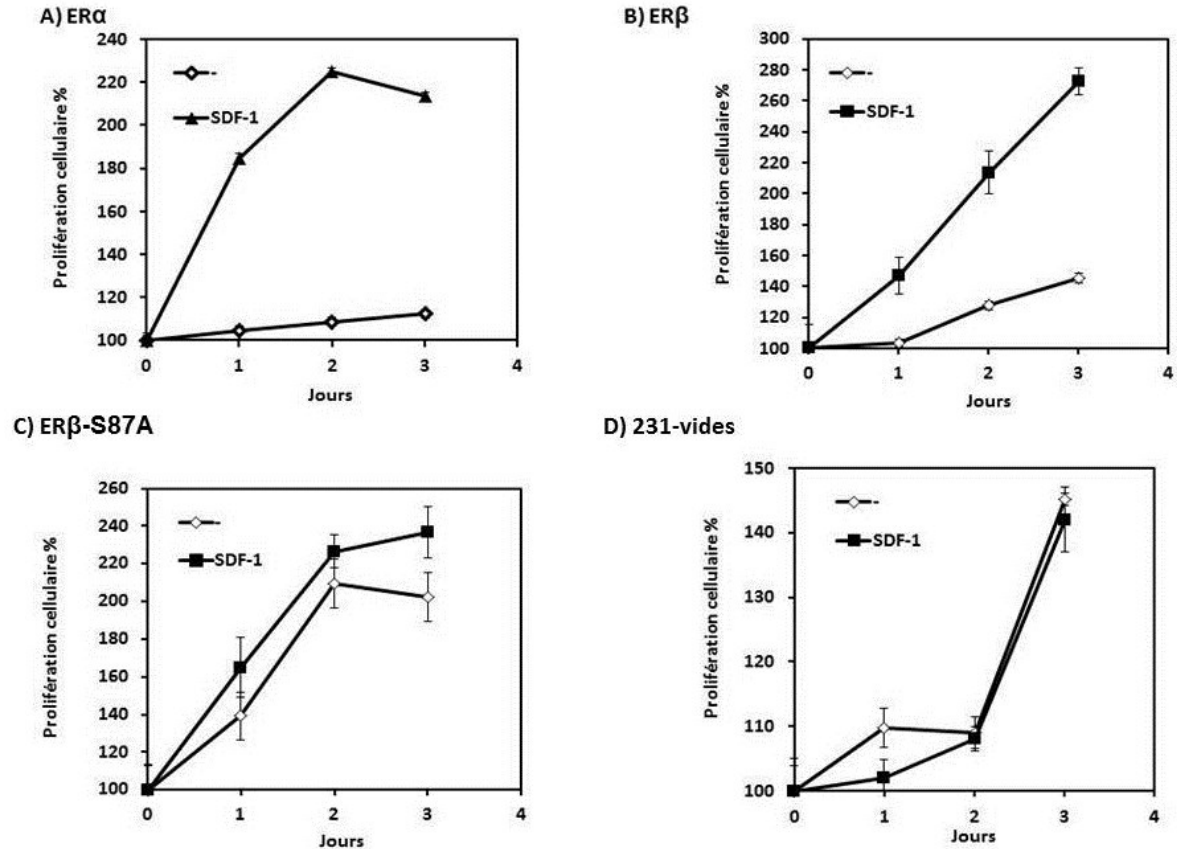


Figure 19 : SDF-1 contribue à la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses de façon dépendante en réponse à SDF-1.

Les lignées 231-ER α (A), 231-ER β (B), 231-ER β -S87A (C) et 231-vides (D) ont été traitées ou non avec 25 nM de SDF-1 sur une durée de 4 jours. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de 3 expériences. Test t de Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ différentes.

4.5. Régulation transcriptionnelle de CXCR4 par les estrogènes

Suite à la réponse positive des cellules 231-ER α et 231-ER β à SDF-1 dans un contexte dépendant des ERs, ces résultats suggèrent un rôle du récepteur CXCR4 dans la régulation ER-SDF-1. Dans le but de tester la contribution de CXCR4 sur la réponse hormonale des cellules cancéreuses, nous avons d'abord déterminé la régulation de l'expression du gène CXCR4 en réponse à l'estrogène dans les cellules MCF-7. La Figure

20 démontre une régulation positive du gène dans les cellules traitées à l'estradiol, suggérant que CXCR4 est une cible des ERs.

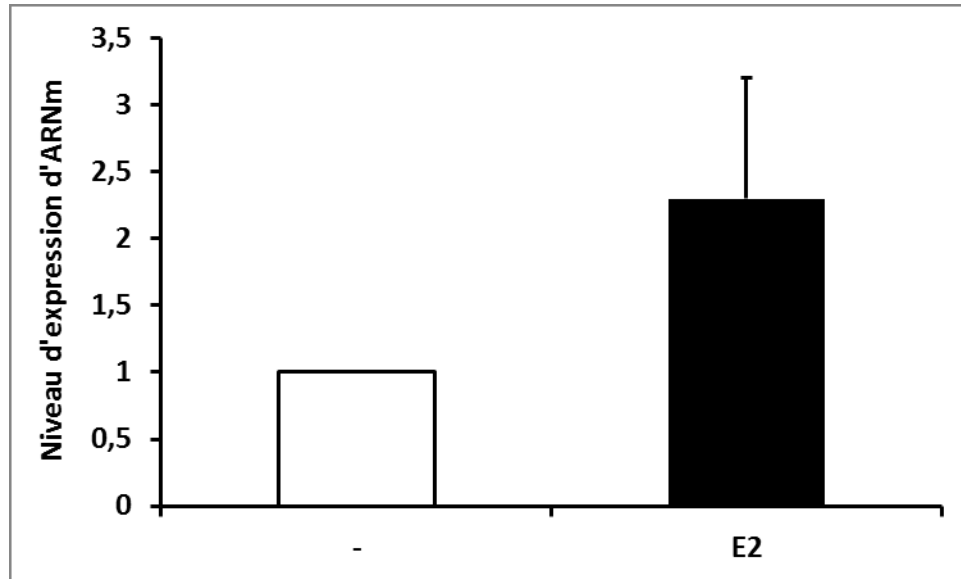


Figure 20 : Analyse de CXCR4 dans les MCF-7

L'expression de l'ARNm de CXCR4 dans MCF-7 a été analysée par q-RT-PCR. Les cellules ont été traitées ou non avec 10nM d'E2 pendant 20 heures. Une réaction de qPCR a été effectuée à partir de 400 ng d'ARN extrait de chaque échantillon en utilisant les amorces spécifiques pour le gène CXCR4. Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de 3 expériences. Test t de Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ différentes.

Dans le but de déterminer la régulation isoforme-spécifique en fonction de ER α ou ER β de CXCR4, nous avons cloné la région proximale du promoteur de CXCR4 en avant du gène rapporteur de la luciférase pour générer le plasmide CXCR4bLuc. Les cellules 293T ont été transfectées transitoirement avec CXCR4BLuc en présence du plasmide pcDNA-ER α ou pcDNA-ER β et testées en essai luciférase en réponse à E2 ou SDF-1. Les résultats obtenus démontrent une augmentation de l'activité transcriptionnelle pour ER α en réponse à E2 ainsi qu'à SDF-1 de respectivement 1,8 et 2,5 fois par rapport aux cellules non-traitées (Figure 21A). De façon similaire, nous avons obtenu une augmentation de 1,9 fois avec ER β en réponse à SDF-1, alors que le traitement à E2 ne

fait augmenter que de 1,1 fois (Figure 21B). Lorsque le mutant ER β S87A est testé, nous observons une baisse importante de l'activité transcriptionnelle du promoteur CXCR4BLuc en réponse à E2 (Figure 21A) et SDF-1 (Figure 21C). Ces résultats suggèrent une régulation du promoteur du gène codant pour CXCR4 par ER α et ER β .

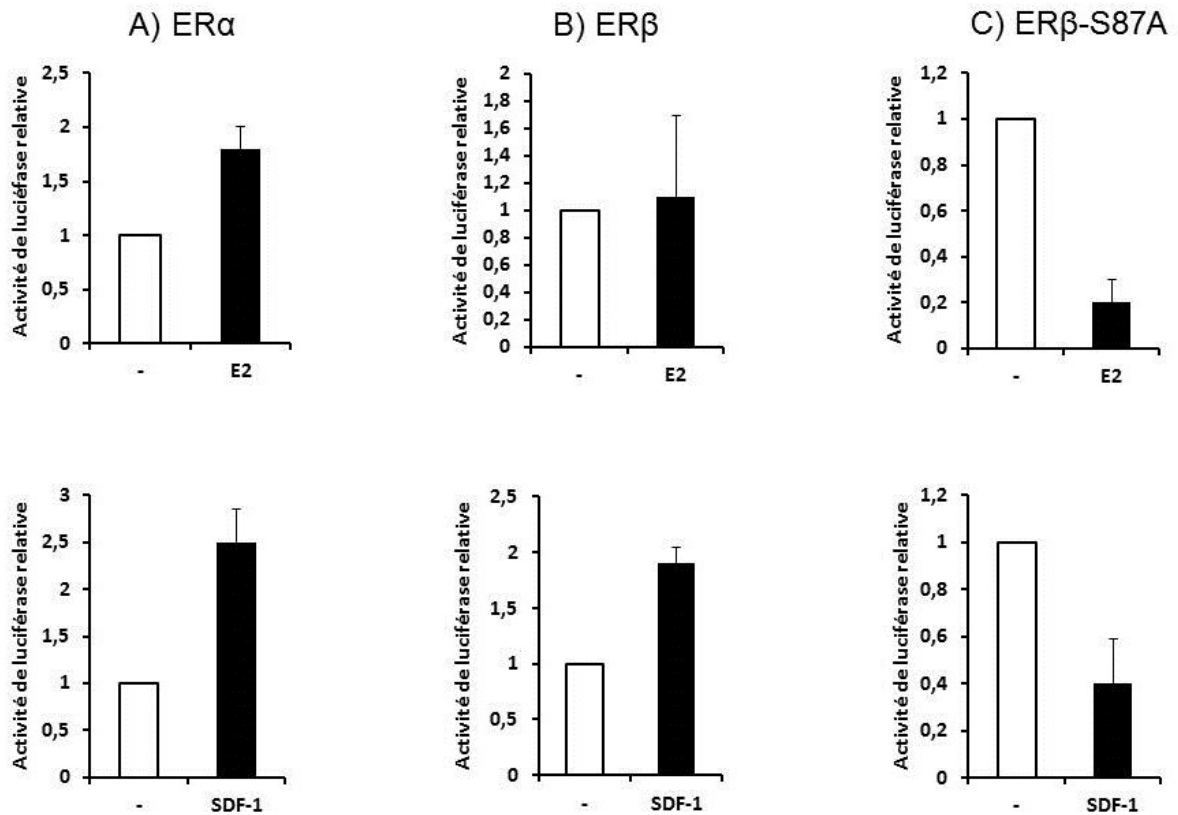


Figure 21 : Régulation transcriptionnelle du promoteur de CXCR4 par ER α et ER β .

Les cellules 293 ont été cotransfectées transitoirement avec le rapporteur CXCR4bLuc et soit pcDNA-ER α (A), pcDNA-ER β (B) ou pcDNA-ER β -S87A (C), puis traitées avec 10nM d'E2 ou 25nM de SDF-1 ou non pendant 20h. Les valeurs d'activité luciférase sont normalisées avec l'activité β -galactosidase et exprimées en activité relative comparée avec le contrôle négatif, soit les cellules non traitées. Les barres d'erreur représentent la moyenne de valeurs en triplicata de trois expériences indépendantes. Test t de Student: * p<0.05, ** p<0.01

Dans le but de caractériser les éléments responsables de cette régulation ER-dépendante, nous avons identifié un élément ERE potentiel dans le promoteur de CXCR4. Pour valider son interaction avec les ERs, nous avons procédé à des essais d'immunoprécipitation de la chromatine ou CHIP en utilisant nos différentes lignées cellulaires qui expriment stablement ER α , ER β ou le mutant ER β -S87A, et ce en traitant les cellules avec soit de l'E2 ou soit SDF-1 pendant 40 min, temps requis pour atteindre un niveau maximal de liaison de ER sur la chromatine (101). Après immunoprécipitation des complexes ER-ADN avec soit un anticorps dirigé contre ER α ou contre ER β , le niveau d'enrichissement de l'ADN a été mesuré par qPCR en utilisant des amorces spécifiques qui englobe le ERE potentiel de CXCR4. Comme contrôle positif, nous avons utilisé des amorces pour le ERE de la région promotrice du gène PR (101).

Les résultats démontrent un recrutement favorisé de ER α (5 fois) et ER β (2,1 fois) au niveau du ERE du promoteur du gène PR dans les lignées 231 correspondantes en réponse à E2 (Figure 22A), validant notre approche CHIP dans ces conditions. De même, ER β -S87A est recruté sur le promoteur de PR avec un enrichissement de 2 fois en réponse à E2. En ce qui concerne la stimulation avec SDF-1, on a observé un recrutement de ER α , ER β et ER β -S87A sur le promoteur de PR avec des enrichissements d'environ 5 fois, 1,8 fois et 1,9 fois respectivement (Figure 22A).

Nous avons par la suite testé le recrutement de ER α et ER β sur le ERE potentiel de CXCR4 dans les mêmes conditions. Les résultats démontrent une augmentation de l'occupation de ER α et ER β pour le traitement à E2 avec un enrichissement d'environ 2,5 fois et 1,7 fois respectivement (Figure 22B). L'augmentation du recrutement de ER α et ER β est aussi observée pour le traitement avec SDF-1 avec un enrichissement d'environ 1,8 fois et 1,9 fois respectivement (Figure 22B). Cependant, pour la lignée ER β -S87A, on a observé une diminution de l'occupation de ERE en réponse à E2 et également SDF-1 avec un niveau de 0,7 fois et 0,45 fois, respectivement (Figure 22B). Ces résultats suggèrent que l'élément ERE du promoteur CXCR4 est fonctionnel dans le recrutement de ER α et ER β et que pour ER β , la sérine 87 est impliquée dans la potentialisation de son recrutement au niveau du promoteur de CXCR4. Nous identifions CXCR4 comme un

déterminant important dans la réponse hormonale des cellules cancéreuses, contribuant ainsi à la boucle de régulation positive entre SDF-1 et les récepteurs des estrogènes.

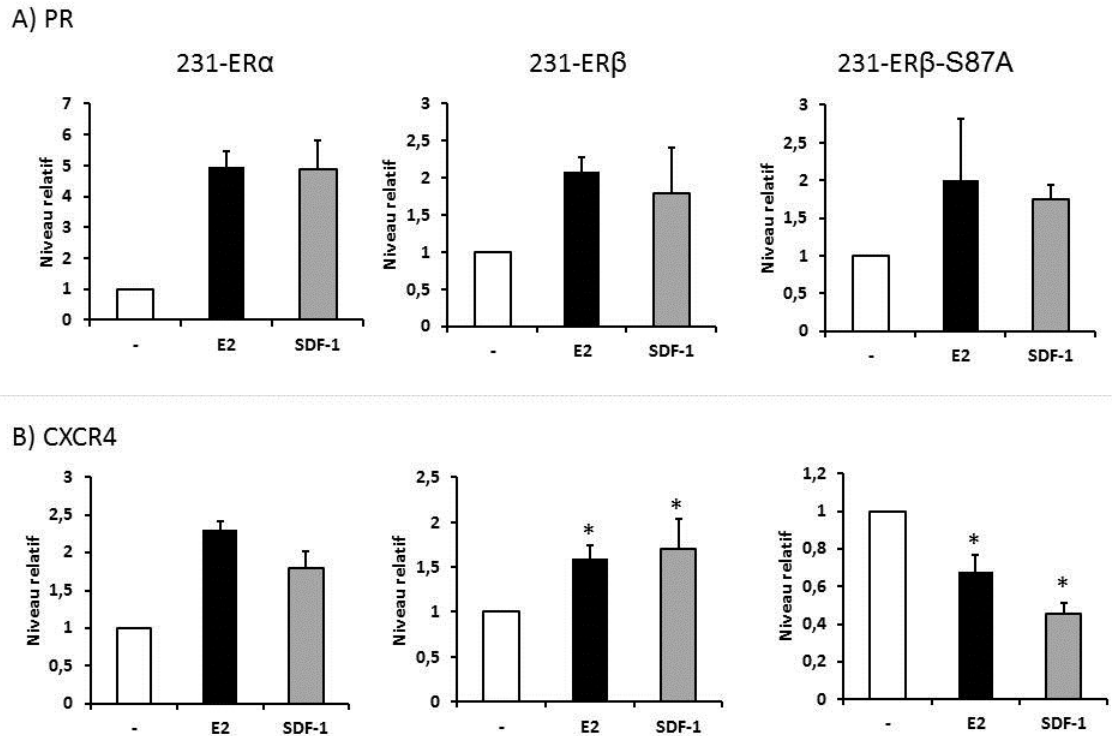


Figure 22 : Recrutement de ER α et ER β au niveau des EREs localisés dans les régions promotrices de PR et CXCR4.

Les cellules des lignées stables 231 ont été traitées pendant 40 min avec de l'E2 10nM ou SDF-1 25nM ou laissées sans traitement. L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée avec un anticorps anti ER α dans les lignées 231-ER α et anti-ER β dans les lignées 231-ER β et la lignée mutante S87A. Un anticorps anti IgG est utilisé comme contrôle négatif. Le niveau d'enrichissement de l'ADN a été quantifié par qPCR en utilisant des amorces qui englobent l'ERE du promoteur de PR (A) et de CXCR4 (B). Les barres d'erreurs représentent l'écart moyen de valeurs de trois expériences différentes. Test t de Student: * p<0.05, ** p<0.01

5. Discussion

SDF-1 appartient à la famille des chimiokines connues pour leur rôle biologique particulier dans le chimiotactisme des cellules et la migration des leucocytes pendant le processus d'inflammation. Cependant, sa co-expression avec son récepteur CXCR4 dans les différents cancers a attiré l'attention des chercheurs envers l'interaction de SDF-1 et CXCR4 dans le processus des métastases. En effet, les cellules tumorales qui expriment CXCR4 peuvent métastaser vers les organes qui expriment SDF-1, tels que les os, les ganglions lymphatiques, les poumons et le foie, comme représenté à la figure 13. Ceci est en lien avec l'effet pléiotropique qu'exerce SDF-1 dans la régulation des processus métastatiques des tumeurs (174). Dans le cancer du sein, SDF-1 a été identifié comme un médiateur clé dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses induite par l'estrogène (175). Comme les estrogènes peuvent favoriser l'expression de SDF-1, les recherches ont pu lier la voie des chimiokine à celle des estrogènes dans le développement du cancer du sein. (101). Tout comme mentionné précédemment, notre laboratoire a non seulement démontré que le gène de SDF-1 est régulé par l'estrogène dans les cellules cancéreuses du sein qui sont ER α et ER β positives, mais que la signalisation de CXCR4 favorisait l'activation transcriptionnelle des deux isoformes de ER. En effet, l'activation de CXCR4 par son ligand SDF-1 active la voie des MAPKs, en particulier Erk1/2, ce qui va induire la phosphorylation de la sérine 87 au niveau de l'AF-1 de ER β . Cette phosphorylation favorise le potentiel transcriptionnel de ER α et ER β à induire l'expression de gènes cibles, dont SDF-1 lui-même (101). Cependant, les mécanismes exacts de régulation qui contrôlent cette boucle autocrine/paracrine positive sont inconnus au niveau du contrôle transcriptionnel des ER en réponse à l'estrogène et à la chimiokine SDF-1 sur la transcription et la régulation de CXCR4.

Dans cette présente étude, nous avons voulu identifier les mécanismes de la régulation transcriptionnelle de ER α et ER β sur l'expression du récepteur des chimiokines CXCR4 en réponse aux ligands impliqués dans cette boucle de régulation positive, soient l'estrogène et SDF-1, afin de valider si CXCR4 est une cible au niveau génomique et aussi à la base de cette boucle de régulation démontrée par nos recherches récentes.

La boucle de régulation autocrine/paracrine qui résulte de l'interaction entre les récepteurs des estrogènes en particulier ER β et le récepteur des chimiokine CXCR4 par l'intermédiaire de la sérine 87 a été mise en évidence dans un système cellulaire qui coexprime les deux isoformes ER α et ER β . Comme discuté dans la section 1.3, la découverte puis le clonage tardif de ER β par rapport à ER α , ont fait en sorte que ER α soit l'isoforme le plus caractérisé. De ce fait, ER β laisse beaucoup de controverses quant à son effet sur l'isoforme ER α et vis-versa. Bien que nous savons que la régulation des chimiokine soit médiée principalement par la sérine 87, le fait que les deux isoformes soient coexprimés dans le modèle cellulaire utilisé, nous a laissé perplexe sur l'effet de chaque isoforme indépendamment de l'autre. Afin d'étudier l'effet de chacun des isoformes sur la boucle de régulation mise en évidence par notre laboratoire, nous avons décidé de générer des lignées cancéreuses du sein qui n'expriment qu'un seul isoforme soit ER α ou ER β .

Dans cette étude, nous avons voulu départager la contribution de chacun des isoformes ER α et ER β dans leur rôle respectif quant à la régulation en réponse à la voie des chimiokines. Pour ce faire et puisque la majorité des systèmes cellulaires de cancer du sein expriment à la fois ER α et ER β , nous avons généré des cellules qui expriment l'un ou l'autre des isoformes à partir de la lignée parentale cancéreuse MDA-MB-231, connue pour être une lignée dépourvue en ER α et ER β (176). On a donc transfecté les cellules MDA-MB-231 de façon stable avec un plasmide d'expression contenant la résistance à la néomycine et codant pour ER α ou ER β ou ER β -S87A, qu'on a stablement transfecté pour construire des systèmes cellulaires qui expriment stablement ER α ou ER β . La lignée du mutant ER β -S87A a aussi été générée afin de démontrer l'impact de l'abolition du site de phosphorylation de la sérine 87 sur la régulation des chimiokines. La lignée 231-vide a également été générée de la même façon, mais avec un vecteur pcDNA n'exprimant pas ER et a donc servi de contrôle négatif pour ER. La validation des différentes lignées générées a été effectuée en premier lieu par un essai luciférase afin de déterminer la réponse transcriptionnelle des ER. Pour ce faire, les lignées stables ont été transfectées transitoirement avec le rapporteur ERE3tkLuc puis traitées avec E2. Dans une première série de clones obtenus, 12 clones ont été sélectionnés et testés en essai luciférase. Cette approche nous a permis d'identifier les clones qui répondaient

adéquatement au traitement à E2, soient trois clones 231-ER α (numéro 1, 7 et 12), deux clones 231-ER β (numéro 1 et 7) et deux clones du mutant 231-ER β -S87A (numéro 2 et 10), tel que représenté à la figure 15. Les autres clones qui n'étaient pas en mesure d'activer la transcription du gène de la luciférase en réponse à E2, probablement dû à une mauvaise intégration du plasmide pcDNA-ER, ont été écartés. Par la suite, nous avons procédé à une validation fonctionnelle des lignées positives en déterminant leur profil génique en réponse à E2. Plusieurs gènes sont connus comme cibles des ERs leur conférant une réponse estrogénique, tels que pS2 (177, 178), PR (101, 179) cathepsine D1 (180), c-myc(181, 182), cycline D1 (183) et SDF-1 (101). Nous avons donc procédé à la validation de l'expression génique en utilisant les gènes cibles de ER que nous utilisons régulièrement au laboratoire pS2, PR et plus récemment SDF-1. Bien que tous les clones isolés aient démontré une activité transcriptionnelle d'au moins deux fois en réponse à E2, seulement un clone stable de chaque lignée, soit 231-ER α -12, 231-ER β -7 et 231-ER β -S87A-2 démontraient un ER fonctionnel pour la transcription des gènes cibles en réponse à E2. Les autres clones ne semblaient pas être en mesure d'induire l'expression hormone-dépendante des gènes cibles testés. Ceci peut être expliqué par le fait que le système de luciférase utilisé soit artificiel et contient trois copies de ERE placées en tandem dans le promoteur en amont du gène de luciférase (ERE3tkLuc), ce qui agit en faveur de la transcription de la luciférase en augmentant les chances de la liaison de ER sur les 3 copies de ERE. On sait que cette situation n'est pas représentative des promoteurs des gènes cibles au niveau endogène, qui eux ne contiennent pour la plupart qu'une seule copie de ERE. Nous avons donc sélectionné les lignées positives 231-ER α -12, 231-ER β -7 et 231-ER β -S87A-2 pour poursuivre l'interprétation des résultats.

Dans les analyses qPCR sur la réponse des gènes PR, pS2 et SDF-1 à E2, nous avons observé une augmentation significative de la transcription des gènes PR et pS2 dans les trois lignées 231-ER α , 231-ER β et 231-ER β -S87A, avec des niveaux d'environ deux fois plus augmentés des gènes régulés par ER α comparativement à ceux régulés par ER β ou par le mutant ER β S87A (Figure 16). En effet, une augmentation de l'expression de pS2 d'environ 6 fois est observée pour ER α comparativement à 2 fois et 4 fois pour ER β et S87A, respectivement. De même, nous observons une augmentation de PR d'environ 8

fois pour ER α , alors que pour ER β et S87A, elle est d'environ 5 fois. Ces résultats sont en lien avec la réponse dite classique des estrogènes qui est surtout favorisée par l'isoforme ER α dans les tissus reproducteurs, comparativement à ER β tel que suggéré par les modèles de souris invalidées pour chaque isoforme (37-40)

De plus, il a été décrit que dans un contexte ER α -positif, comme dans les cellules de cancer du sein T47-D, l'expression de ER β semble antagoniser l'activité de ER α , avec pour effet de réduire le niveau d'ARNm de pS2 et PR (184). Par contre, en absence de ER α , l'expression de ER β permet de réguler positivement plusieurs gènes cibles en réponse à l'estrogène, tel que démontré dans des cellules de cancer du sein comme la lignée Hs578t (30, 101). Nos résultats utilisant la lignée MDA-MB-231 nous permettent de conclure que ER α et ER β partagent certains gènes cibles mais ne possèdent pas le même potentiel pour induire leur expression en réponse hormonale.

En ce qui a trait à la régulation du gène SDF-1, nous observons une augmentation significative de 4 fois et 12 fois pour ER α et ER β respectivement, alors que pour le mutant S87A, l'augmentation du gène SDF-1 n'est qu'environ de 1,5 fois ce qui n'est pas très significatif comparativement à ER α et surtout ER β . Pour expliquer la différence de régulation de SDF-1 entre ER β et ER α , il faut faire référence aux différences structurales entre les deux isoformes, surtout au niveau du domaine AF-1 et au travail publié par notre laboratoire, qui met en évidence la boucle de régulation entre les estrogènes et les chimiokines, principalement pour ER β (101). Comme mentionné dans la section 1.4.1 et en lien avec la section 5.12, la transcription hormone-dépendante de SDF-1 est induite à la fois par ER α et ER β , mais la phosphorylation du domaine AF-1 de ER β confère une optimisation de l'effet d'induction par ER β , comparativement à ER α , en lien avec un effet plus marqué de l'expression de SDF-1 sous contrôle de ER β . De plus, comme démontré par notre laboratoire, l'augmentation des niveaux d'ARNm de SDF-1 par ER β est dépendant de la phosphorylation de la sérine 87, ce qui concorde avec la diminution drastique des niveaux de SDF-1 en réponse à E2 dans la lignée mutante 231-ER β -S87A (Figure 16C). Ces résultats permettent de conclure que la différence de réponse à l'estrogène entre les deux isoformes de ER du moins pour le gène cible SDF-1 est

largement dépendante de la différence structurelle et fonctionnelle du domaine AF-1 de ER α et ER β .

En vérifiant l'intégrité de l'expression protéique de ER dans les lignées stables par Western blot, nous avons remarqué que la quantité de ER α est supérieure à ER β et aussi ER β -S87A et ceci est aussi valable pour les contrôles positifs exprimés de façon transitoire (Figure 17). Cette variabilité dans l'expression de ER α et ER β est sans doute expliquée par le cycle de dégradation (turnover) différent de chacun des récepteurs. La dégradation de ER α est induite par différents facteurs, en particulier E2 (185), mais comme les milieux dans lesquels sont cultivés les cellules sont dépourvus de E2 ou de rouge de phénol (activité estrogénique), ceci permet de prolonger la demi-vie et d'accumuler ER α . La diminution de l'expression protéique pour ER β et le mutant S87A peut être expliquée par un turnover plus rapide de ER β par rapport à ER α . En effet, notre laboratoire a démontré que le domaine AF-1 de ER β contribuait à l'activation de la dégradation du récepteur dans un processus dépendant de la voie ubiquitine-protéasome en réponse à la phosphorylation de certains résidus de l'AF-1, dont les sérines 95 et 106 (99). Ce qui nous mène à constater un autre aspect dans la divergence entre les deux isoformes et soulever une différence dans la stabilité des deux isoformes.

Nous avons par la suite déterminé la contribution des deux isoformes de ER sur la prolifération cellulaire en réponse à E2 et à SDF-1. Les résultats obtenus démontrent que la prolifération dans les cellules 231-ER α et 231-ER β est accrue quand on les traite avec E2 (Figure 18A, 18B) ou SDF-1 (Figure 19A, 19B) comparativement aux cellules 231-vides où ni le traitement à E2 ni celui à SDF-1 (Figure 18D, 19D) ne présentent une différence dans la croissance cellulaire par rapport aux cellules non traitées. Rappelant que les lignées stables étaient au départ ER-, ces résultats suggèrent l'implication de ER α et ER β dans une prolifération plus accrue du cancer du sein quand il ER+ comparativement à la prolifération quand cancer le sein du sein est ER-. Dans la lignée mutante 231-ER β -S87A le traitement à E2 (Figure 18C) comme celui avec SDF-1 (Figure 19C) favorise la croissance cellulaire, mais de façon beaucoup moins significative comparativement à ER β ou même ER α . Comme la chimiokine SDF-1 est connue pour favoriser la prolifération cellulaire dans le cancer du sein, et que son

expression est potentialisée par la phosphorylation de la sérine 87, il n'est donc pas surprenant que la croissance des cellules dans la lignée mutante soit diminuée en réponse à E2 comme à SDF-1. De plus, malgré le fait que la régulation de SDF-1 passe aussi par l'activation de son récepteur CXCR4, le mécanisme qui implique CXCR4 reste inconnu au niveau du contrôle transcriptionnel de CXCR4 par les récepteurs des estrogènes.

Dans le but de mieux caractériser la boucle de régulation autocrine/paracrine entre la voie des chimiokines et celle des estrogènes, nous avons voulu déterminer la régulation de l'expression du gène CXCR4 par les ERs en réponse à E2. Malheureusement, dans les lignées stables que nous avons générées nous n'avons pas eu une augmentation du gène CXCR4, ce qui peut être expliqué par la coopération perdue entre ER α et ER β pour la régulation de CXCR4, en effet, lignées stables n'expriment que l'un ou l'autre des deux isoformes.

Nous avons donc testé un autre système cellulaire soit la lignée cancéreuse MCF-7 qui exprime de façon endogène ER α et ER β . En réponse à la stimulation estrogénique, nous avons obtenu une régulation positive du gène CXCR4, soit une augmentation significative d'environ 2,5 fois (Figure 20), ce qui nous indique que CXCR4 est un gène cible des ERs. Ce résultat peut nous indiquer que la régulation génique de CXCR4 par l'estrogène (E2) exige la présence des deux isoformes de ER. En référence à la section 1.6, nous pouvons expliquer ce résultat par la redondance entre ER α et ER β . En effet, la coexpression des deux isoformes dans un système cellulaire, peut inciter les deux isoformes à se dimériser et lier le même élément de réponse ERE des promoteurs de certains gènes cibles (47-49). Ce qui nous mène à conclure que la régulation du gène CXCR4 passe par l'hétérodimère ER α /ER β .

Pour étudier la régulation de CXCR4 par les ER, nous avons cloné le promoteur CXCR4bLuc et nous l'avons testé en essai luciférase. L'utilisation du rapporteur bluc au lieu du tkLuc était dans le but de se rapprocher du contexte endogène et d'éliminer la possibilité que la transcription de la luciférase soit due à la liaison de ER sur le promoteur tk (Thymidine kinase) et non pas à ERE. Les résultats de la luciférase concordent parfaitement avec ceux obtenus en CHIP entre les deux isoformes en réponse à E2 ou SDF-1, seulement pour ER β nous observons une augmentation de l'activité luciférase en

réponse à SDF-1 et aucune augmentation dans l'activité luciférase en réponse à E2 et pour le mutant S87A où l'augmentation du recrutement en CHIP en réponse à E2 qu'on observe plutôt une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur en réponse à E2 (Figure 21C). En accordant ces observations, on peut conclure que la régulation de CXCR4 se fait par ER α comme par ER β , mais pour ce dernier, la régulation de CXCR4 est préférentiellement augmentée par la voie des chimiokines, et cette voie de chimiokine est médiée par SDF-1 qui a pour cible la sérine 87

Dans le même contexte du promoteur de CXCR4, et afin de caractériser la boucle qui fait intervenir SDF-1 et ER, nous avons procédé à l'identification d'un élément de liaison de ER (ERE) sur le promoteur de CXCR4. Nous avons identifié l'élément ERE sur le génome humain avec le logiciel MacVector. Nous avons par la suite testé cet élément dans les lignées stables générées en réponse à E2 par la technique CHIP. (Voir la section 4.7). Ainsi, nous avons traité les trois lignées cellulaires avec E2 ou SDF-1 que nous avons comparées aux cellules non-traitées. Les résultats démontrant le recrutement de ER α ou ER β au niveau de ERE du promoteur du gène PR en réponse à E2 ou à SDF-1, nous confirme que le système ER-ERE est fonctionnel dans les lignées stables. De même pour la mutante S87A, nous avons obtenu une augmentation dans l'occupation de ER au niveau de ERE du gène PR en réponse à E2 comme à SDF-1. De ces résultats nous concluons que la sérine 87 n'est pas impliquée dans la régulation du gène PR. (Figure 22A). Pour le promoteur du gène investigué CXCR4, nos résultats démontrent une augmentation du recrutement de ER α comme pour ER β au niveau de ERE de CXCR4 en réponse à E2 ou à SDF-1. Par contre, le recrutement du mutant S87A au niveau de ERE du promoteur de CXCR4 est réduit par le traitement avec E2 comme par le traitement avec SDF-1. (Figure 22B). La diminution du recrutement de ER β -S87A sur le promoteur CXCR4 implique le rôle de la phosphorylation de la sérine 87 dans la régulation du gène de CXCR4. En accordant ces observations, on peut conclure que la régulation de CXCR4 se fait par ER α comme par ER β , mais pour ce dernier, la régulation de CXCR4 est préférentiellement augmentée par la voie des chimiokines, et cette voie de chimiokine est médiée par E2 comme par SDF-1 qui a pour cible la sérine 87.

Nos résultats nous permettent d'établir un modèle de régulation faisant intervenir les récepteurs des estrogènes et le récepteur des chimiokine CXCR4 dans une boucle de

régulation positive, tel qu'illustrée à la figure 23. Dans ce modèle, nous suggérons que dans un contexte cellulaire discriminant les deux isoformes ER α et ER β , la régulation du gène de CXCR4 se fait par son ligand la chimiokine SDF-1. Ce dernier se lie à CXCR4 et induit son activation transcriptionnelle qui va induire la transcription des gènes cibles entre autre SDF-1 et CXCR4. L'augmentation de SDF-1 et CXCR4 entraîne l'activation de ER β et potentialise son activité transcriptionnelle. Ainsi, une boucle de régulation autocrine positive est créée impliquant SDF-1 et son récepteur CXCR4, ce qui mène à une prolifération accrue des cellules cancéreuses (Figure 23).

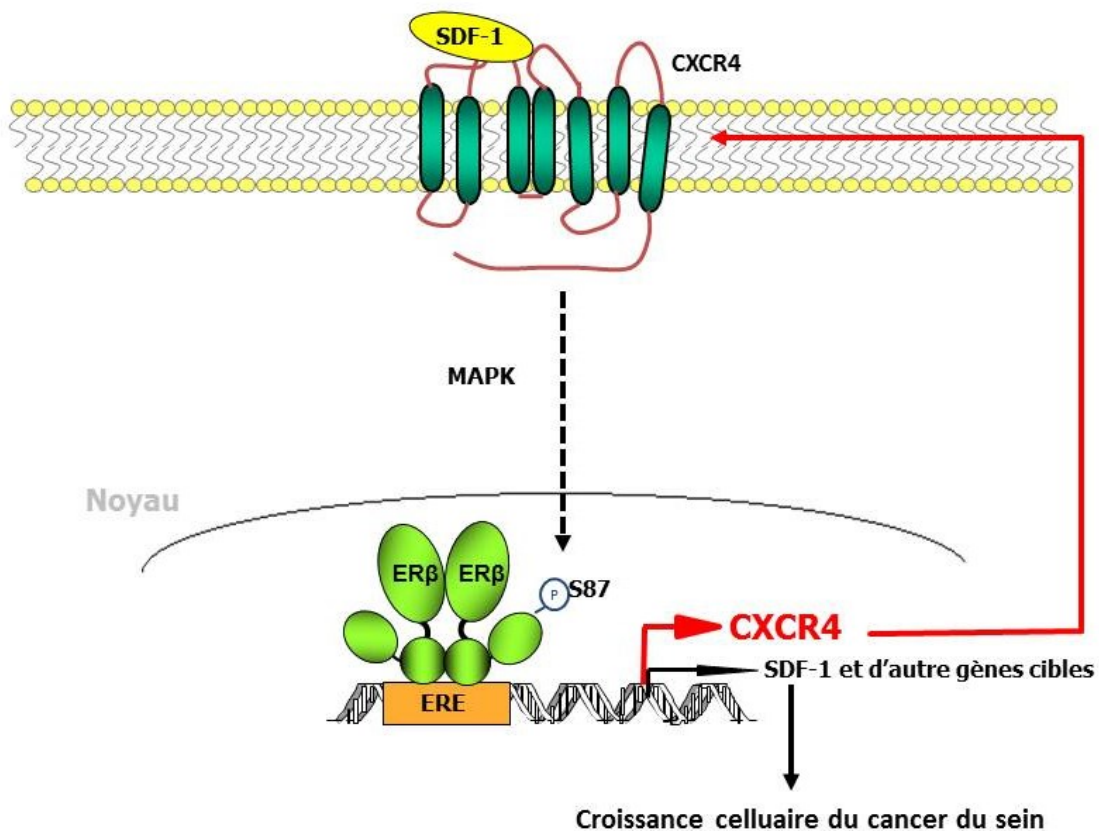


Figure 23 : Modèle proposé de l'axe de régulation transcriptionnelle ER β -CXCR4 dans les cellules cancéreuses.

La chimiokine SDF-1 se lie au récepteur des chimiokines CXCR4 pour induire un signal cellulaire conduisant à la phosphorylation de la sérine 87 au niveau du domaine AF-1 de ER β . La phosphorylation de ER β provoque son activation transcriptionnelle, favorisant l'expression des gènes cibles dont SDF-1 et CXCR4. L'augmentation de SDF-1 et

CXCR4 permet à son tour de favoriser l'activation de ER β , créant une boucle de régulation autocrine positive, et une prolifération accrue des cellules cancéreuses.

Conclusion

Le but de ce travail était de déterminer les rôles respectifs des deux isoformes des récepteurs des estrogènes ER α et ER β en ce qui concerne leur réponse transcriptionnelles dans la régulation du gène codant pour le récepteur des chimiokines CXCR4. En plus d'établir CXCR4 comme déterminant essentiel à la boucle de régulation autocrine ER/SDF-1. En effet, nous avons pu conclure que la régulation de CXCR4 se fait par ER α comme par ER β . De plus, pour ER β , la régulation de CXCR4 est aussi favorisée par la voie des chimiokines, et cette voie est médiée par SDF-1 qui cible préférentiellement la sérine 87.

Nos résultats suggèrent qu'en réponse à SDF-1, l'isoforme ER β est recruté sur le promoteur de CXCR4 pour favoriser son expression. La régulation de la transcription des gènes est un processus complexe qui met en jeu plusieurs facteurs. Comme déjà discuté, ER β étant un facteur de transcription ne peut pas lui tout seul activer ou réprimer la transcription d'un gène donné. Sa capacité à initier ou de réprimer la transcription de ses gènes cibles dépend fortement de son interaction avec des corégulateurs: coactivateurs et corépresseurs qui ont été décrits dans les sections 1.7.2.1 et 1.7.2.2. La prochaine étape consistera donc à déterminer si l'expression de CXCR4 par ER β n'est que le résultat du recrutement de coactivateurs, ceci peut se réaliser en faisant appel à technique de CHIP. Plusieurs coactivateurs ont été décrits dans la littérature on en cite PRMT1 et CARM1 (61-63). On s'attend donc à observer un recrutement d'un de ces coactivateurs après la stimulation de la signalisation cellulaire par la chimiokine SDF-1, qui va son tour recruter l'histone acétyltransférase. La technique de CHIP nous permettra aussi de vérifier la présence des marqueurs d'histones. Le recrutement de l'histone acétyltransférase signifie que la chromatine est dans un état décondensé et ouvert ce qui rend le promoteur accessible à la machinerie transcriptionnelle pour ainsi favoriser la transcription des gènes cibles.

En résumé, les résultats obtenus de ce travail démontrent que CXCR4 est un gène cible de ER α en réponse à E2 et constitue aussi un gène cible pour ER β en réponse aux signaux cellulaires induits par la chimiokine du récepteur CXCR4 soit SDF-1. ER β est recruté sur le site ERE identifié sur le promoteur de CXCR4 où il favorise son expression. Cette étude identifie donc CXCR4 comme gène cible des récepteurs des estrogènes dans les tissus

reproducteurs et suggère un mécanisme pour l'activation transcriptionnelle de CXCR4 par les estrogènes pour ER α et par SDF-1 pour ER β . Compte tenu du rôle des estrogènes et celui des chimiokines dans la croissance cellulaire et dans la tumorigenèse, l'identification de la régulation ER/CXCR4 peut devenir une nouvelle voie dont l'investigation est importante dans les pathologies hormone-dépendantes.

Biographie

1. Nilsson S, Gustafsson J-Å. Estrogen Receptors: Their Actions and Functional Roles in Health and Disease
Nuclear Receptors. In: Bunce CM, Campbell MJ, editors. *Proteins And Cell Regulation*. 8: Springer Netherlands; 2010. p. 91-141.
2. Hillier SG. Intrafollicular paracrine function of ovarian androgen. *Journal of steroid biochemistry*. 1987;27(1-3):351-7. PubMed PMID: 3121920. Epub 1987/01/01. eng.
3. Ghayee HK, Auchus RJ. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Dec;8(4):289-300. PubMed PMID: 17926129. Epub 2007/10/11. eng.
4. Ghayee H, Auchus R. Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 2007;8(4):289-300.
5. Porter JC. Proceedings: Hormonal regulation of breast development and activity. *The Journal of investigative dermatology*. 1974 Jul;63(1):85-92. PubMed PMID: 4600633. Epub 1974/07/01. eng.
6. Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000 May;85(5):2057-67. PubMed PMID: 10843196. Epub 2000/06/08. eng.
7. Mahony S, Auron P, Benos P. DNA familial binding profiles made easy: comparison of various motif alignment and clustering strategies. *PLoS Comput Biol*. 2007;3:e61. PubMed PMID: doi:10.1371/journal.pcbi.0030061.
8. Clarkson TB, Anthony MS, Klein KP. Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model. *British journal of obstetrics and gynaecology*. 1996 May;103 Suppl 13:53-7; discussion 7-8. PubMed PMID: 8624344. Epub 1996/05/01. eng.
9. Walsh BW. The effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators on cardiovascular risk factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001 Dec;949:163-7. PubMed PMID: 11795349. Epub 2002/01/25. eng.
10. Lufkin T, Mark M, Hart CP, Dolle P, LeMeur M, Chambon P. Homeotic transformation of the occipital bones of the skull by ectopic expression of a homeobox gene. *Nature*. 1992 Oct 29;359(6398):835-41. PubMed PMID: 1359423. Epub 1992/10/29. eng.
11. Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Journal of neurobiology*. 1999 Sep 15;40(4):574-84. PubMed PMID: 10453057. Epub 1999/08/24. eng.
12. Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzei L, et al. Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nature medicine*. 1998 Apr;4(4):447-51. PubMed PMID: 9546791. Epub 1998/04/18. eng.
13. Mulnard RA, Cotman CW, Kawas C, van Dyck CH, Sano M, Doody R, et al. Estrogen replacement therapy for treatment of mild to moderate Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *Alzheimer's Disease Cooperative Study*. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2000 Feb 23;283(8):1007-15. PubMed PMID: 10697060. Epub 2000/03/04. eng.

14. Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular aspects of medicine*. 2006 Aug;27(4):299-402. PubMed PMID: 16914190. Epub 2006/08/18. eng.
15. Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M, Bresciani F. Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogene. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1990 Jul;4(7):1041-50. PubMed PMID: 2126598. Epub 1990/07/01. eng.
16. Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, et al. Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocrine-related cancer*. 2007 Jun;14(2):169-87. PubMed PMID: 17639036. Epub 2007/07/20. eng.
17. Jacobson HI, Gupta GN, Fernandez C, Hennix S, Jensen EV. Determination of tritium in biological material. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1960 1//;86(1):89-93.
18. Toft D, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966 Jun;55(6):1574-81. PubMed PMID: 5227676. Pubmed Central PMCID: PMC224361. Epub 1966/06/01. eng.
19. P Walter SG, G Greene, A Krust, J M Bornert, J M Jeltsch, A Staub, E Jensen, G Scrace, M Waterfield. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 December;82(23):7889-93.
20. Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York, NY)*. 1986 Mar 7;231(4742):1150-4. PubMed PMID: 3753802. Epub 1986/03/07. eng.
21. G G Kuiper EE, M Pelto-Huikko, S Nilsson, and J A Gustafsson. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 June 11;93(12):5925-30. .
22. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1997 Mar;11(3):353-65. PubMed PMID: 9058381. Epub 1997/03/01. eng.
23. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*. 1996 Aug 19;392(1):49-53. PubMed PMID: 8769313. Epub 1996/08/19. eng.
24. Aranda A PA. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev*. 2001;81:1269-304.
25. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1987 Dec 24;51(6):941-51. PubMed PMID: 3690665. Epub 1987/12/24. eng.
26. Kumar R, Thompson EB. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003 Jan;17(1):1-10. PubMed PMID: 12511601. Epub 2003/01/04. eng.
27. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003 Oct;17(10):1901-9. PubMed PMID: 12893880. Epub 2003/08/02. eng.

28. Kumar R, Thompson EB. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999 May;64(5):310-9. PubMed PMID: 10406480. Epub 1999/07/16. eng.
29. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neeffjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science*. 2010 Apr 15;123(Pt 8):1253-61. PubMed PMID: 20332105. Epub 2010/03/25. eng.
30. Sanchez M, Sauve K, Picard N, Tremblay A. The hormonal response of estrogen receptor beta is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Feb 16;282(7):4830-40. PubMed PMID: 17166829. Epub 2006/12/15. eng.
31. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in pharmacological sciences*. 2000 Oct;21(10):381-8. PubMed PMID: 11050318. Epub 2000/10/26. eng.
32. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature structural biology*. 1996 Jan;3(1):87-94. PubMed PMID: 8548460. Epub 1996/01/01. eng.
33. Warnmark A, Almlof T, Leers J, Gustafsson JA, Treuter E. Differential recruitment of the mammalian mediator subunit TRAP220 by estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jun 29;276(26):23397-404. PubMed PMID: 11303023. Epub 2001/04/17. eng.
34. Skafar DF, Zhao C. The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine*. 2008 Feb;33(1):1-8. PubMed PMID: 18363044. Epub 2008/03/26. eng.
35. Nilsson S, Gustafsson JA. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2011 Jan;89(1):44-55. PubMed PMID: 21124311. Epub 2010/12/03. eng.
36. Couse JF, Curtis Hewitt S, Korach KS. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000 Nov 30;74(5):287-96. PubMed PMID: 11162937. Epub 2001/02/13. eng.
37. Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology*. 1998 Dec;139(12):5070-81. PubMed PMID: 9832446. Epub 1998/12/01. eng.
38. Kregel JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Dec 22;95(26):15677-82. PubMed PMID: 9861029. Pubmed Central PMCID: PMC28103. Epub 1998/12/23. eng.
39. Ogawa S, Chan J, Chester AE, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999 Oct 26;96(22):12887-92. PubMed PMID: 10536018. Pubmed Central PMCID: PMC23148. Epub 1999/10/27. eng.
40. Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, et al. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science (New York, NY)*. 1999 Dec 17;286(5448):2328-31. PubMed PMID: 10600740. Epub 1999/12/22. eng.

41. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. Recent progress in hormone research. 2002;57:385-409. PubMed PMID: 12017554. Epub 2002/05/23. eng.
42. Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. Circulation research. 2002 Mar 8;90(4):413-9. PubMed PMID: 11884370. Epub 2002/03/09. eng.
43. McEwen B, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, et al. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001 June 19, 2001;98(13):7093-100.
44. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Feb 27;98(5):2792-6. PubMed PMID: 11226319. Pubmed Central PMCID: PMC30218. Epub 2001/02/28. eng.
45. Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jan 21;100(2):703-8. PubMed PMID: 12515851. Pubmed Central PMCID: PMC141060. Epub 2003/01/08. eng.
46. Krezel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Oct 9;98(21):12278-82. PubMed PMID: 11593044. Pubmed Central PMCID: PMC59805. Epub 2001/10/11. eng.
47. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. The Journal of biological chemistry. 1997 Aug 8;272(32):19858-62. PubMed PMID: 9242648. Epub 1997/08/08. eng.
48. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 1997 Sep;11(10):1486-96. PubMed PMID: 9280064. Epub 1997/09/01. eng.
49. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. Molecular cell. 1999 Apr;3(4):513-9. PubMed PMID: 10230404. Epub 1999/05/07. eng.
50. Grober O, Mutarelli M, Giurato G, Ravo M, Cicatiello L, De Filippo M, et al. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. BMC Genomics. 2011;12(1):36. PubMed PMID: doi:10.1186/1471-2164-12-36.
51. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. Mol Interv. 2003 Aug;3(5):281-92. PubMed PMID: 14993442. Epub 2004/03/03. eng.
52. O'Malley BW. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 2005 Jun;19(6):1402-11. PubMed PMID: 15914709. Epub 2005/05/26. eng.
53. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiol Rev. 2007 Jul;87(3):905-31. PubMed PMID: 17615392. Epub 2007/07/07. eng.

54. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):538-41. PubMed PMID: 11029009. Pubmed Central PMCID: PMC2670482. Epub 2000/10/12. eng.
55. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews*. 1997 Jun;18(3):306-60. PubMed PMID: 9183567. Epub 1997/06/01. eng.
56. Klinge CM, Jernigan SC, Mattingly KA, Risinger KE, Zhang J. Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors alpha and beta by coactivators and corepressors. *J Mol Endocrinol*. 2004 Oct;33(2):387-410. PubMed PMID: 15525597. Epub 2004/11/05. eng.
57. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocrine reviews*. 2011 Oct;32(5):597-622. PubMed PMID: 21680538. Epub 2011/06/18. eng.
58. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews*. 1999 Jun;20(3):321-44. PubMed PMID: 10368774. Epub 1999/06/16. eng.
59. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology*. 2004;66:315-60. PubMed PMID: 14977406. Epub 2004/02/24. eng.
60. Taatjes DJ, Marr MT, Tjian R. Regulatory diversity among metazoan co-activator complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 05//print;5(5):403-10.
61. Hall J, Couse J, Korach K. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:36869 - 72. PubMed PMID: doi:10.1074/jbc.R100029200.
62. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jul;6(7):542-54. PubMed PMID: 15957004. Epub 2005/06/16. eng.
63. Xu J, O'Malley BW. Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Rev Endocr Metab Disord*. 2002 Sep;3(3):185-92. PubMed PMID: 12215713. Epub 2002/09/07. eng.
64. Kershah SM, Desouki MM, Koterba KL, Rowan BG. Expression of estrogen receptor coregulators in normal and malignant human endometrium. *Gynecologic oncology*. 2004 Jan;92(1):304-13. PubMed PMID: 14751175. Epub 2004/01/31. eng.
65. Karmakar S, Foster EA, Blackmore JK, Smith CL. Distinctive functions of p160 steroid receptor coactivators in proliferation of an estrogen-independent, tamoxifen-resistant breast cancer cell line. *Endocrine-related cancer*. 2011 Feb;18(1):113-27. PubMed PMID: 21059860. Pubmed Central PMCID: PMC3014261. Epub 2010/11/10. eng.
66. Shao W, Rosenauer A, Mann K, Chang C-PB, Rachez C, Freedman LP, et al. Ligand-inducible interaction of the DRIP/TRAP coactivator complex with retinoid receptors in retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*. 2000 September 15, 2000;96(6):2233-9.
67. Dobrzycka KM, Townson SM, Jiang S, Oesterreich S. Estrogen receptor corepressors - a role in human breast cancer? *Endocrine-related cancer*. 2003 Dec;10(4):517-36. PubMed PMID: 14713265. Epub 2004/01/10. eng.

68. Hong W, Chen L, Li J, Yao Z. Inhibition of MAP kinase promotes the recruitment of corepressor SMRT by tamoxifen-bound estrogen receptor alpha and potentiates tamoxifen action in MCF-7 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 May 28;396(2):299-303. PubMed PMID: 20406620. Epub 2010/04/22. eng.
69. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research*. 2001 July 15, 2001;29(14):2905-19.
70. Wang C, Mayer JA, Mazumdar A, Fertuck K, Kim H, Brown M, et al. Estrogen induces c-myc gene expression via an upstream enhancer activated by the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2011 Sep;25(9):1527-38. PubMed PMID: 21835891. Pubmed Central PMCID: PMC3165912. Epub 2011/08/13. eng.
71. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, et al. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2000 Nov 30;74(5):311-7. PubMed PMID: 11162939. Epub 2001/02/13. eng.
72. Chen GG, Zeng Q, Tse GM. Estrogen and its receptors in cancer. *Medicinal research reviews*. 2008 Nov;28(6):954-74. PubMed PMID: 18642351. Epub 2008/07/22. eng.
73. Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, et al. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Oct 29;93(22):12626-30. PubMed PMID: 8901633. Pubmed Central PMCID: PMC38043. Epub 1996/10/29. eng.
74. Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL. Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*. 1990 Sep 25;265(27):16548-55. PubMed PMID: 2398063. Epub 1990/09/25. eng.
75. Song RX, Chen Y, Zhang Z, Bao Y, Yue W, Wang JP, et al. Estrogen utilization of IGF-1-R and EGF-R to signal in breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010 Feb 28;118(4-5):219-30. PubMed PMID: 19815064. Pubmed Central PMCID: PMC2826506. Epub 2009/10/10. eng.
76. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007;87:905 - 31. PubMed PMID: doi:10.1152/physrev.00026.2006.
77. Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7979-89. PubMed PMID: 15489915. Epub 2004/10/19. eng.
78. Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2005 Oct;16(8):347-53. PubMed PMID: 16126407. Epub 2005/08/30. eng.
79. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Nov 12;99(23):14783-8. PubMed PMID: 12415108. Pubmed Central PMCID: PMC137496. Epub 2002/11/05. eng.

80. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Challenging estrogen receptor beta with phosphorylation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2010 Feb;21(2):104-10. PubMed PMID: 19837602. Epub 2009/10/20. eng.
81. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):753-8. PubMed PMID: 9338790. Epub 1997/10/24 21:29. eng.
82. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)*. 2002 Dec 6;298(5600):1912-34. PubMed PMID: 12471243. Epub 2002/12/10. eng.
83. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res*. 1998 Mar 1;58(5):877-81. PubMed PMID: 9500442. Epub 1998/03/21. eng.
84. Chen D, Washbrook E, Sarwar N, Bates GJ, Pace PE, Thirunuvakkarasu V, et al. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene*. 2002 Jul 25;21(32):4921-31. PubMed PMID: 12118371. Epub 2002/07/16. eng.
85. Henrich LM, Smith JA, Kitt D, Errington TM, Nguyen B, Traish AM, et al. Extracellular signal-regulated kinase 7, a regulator of hormone-dependent estrogen receptor destruction. *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(17):5979-88. PubMed PMID: 12917323. Pubmed Central PMCID: PMC180983. Epub 2003/08/15. eng.
86. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Sep 23;280(38):33006-14. PubMed PMID: 16076840. Epub 2005/08/04. eng.
87. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Molecular cell*. 2005 Apr 1;18(1):71-82. PubMed PMID: 15808510. Epub 2005/04/06. eng.
88. Sheeler CQ, Singleton DW, Khan SA. Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocrine research*. 2003 May;29(2):237-55. PubMed PMID: 12856811. Epub 2003/07/15. eng.
89. Dutertre M, Smith CL. Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003 Jul;17(7):1296-314. PubMed PMID: 12714702. Epub 2003/04/26. eng.
90. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA. pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):1978-84. PubMed PMID: 9528769. Pubmed Central PMCID: PMC121427. Epub 1998/04/07. eng.
91. Shah YM, Rowan BG. The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity.

- Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 2005 Mar;19(3):732-48. PubMed PMID: 15528270. Epub 2004/11/06. eng.
92. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Aug 6;274(32):22296-302. PubMed PMID: 10428798. Epub 1999/07/31. eng.
93. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *J Mol Endocrinol*. 2008 Apr;40(4):173-84. PubMed PMID: 18372406. Pubmed Central PMCID: PMC2277492. Epub 2008/03/29. eng.
94. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1002-15. PubMed PMID: 9891036. Pubmed Central PMCID: PMC116031. Epub 1999/01/16. eng.
95. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shupnik MA. Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2730-8. PubMed PMID: 15033909. Epub 2004/03/23. eng.
96. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R. Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to upregulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS letters*. 2004 Jun 4;567(2-3):243-7. PubMed PMID: 15178330. Epub 2004/06/05. eng.
97. Tharakan R, Lepont P, Singleton D, Kumar R, Khan S. Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Nov 25;295(1-2):70-8. PubMed PMID: 18755239. Epub 2008/08/30. eng.
98. Tremblay A, Giguere V. Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor beta. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001 Apr;77(1):19-27. PubMed PMID: 11358671. Epub 2001/05/19. eng.
99. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, et al. Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008 Feb;22(2):317-30. PubMed PMID: 17962381. Pubmed Central PMCID: PMC2346536. Epub 2007/10/27. eng.
100. Sanchez M, Picard N, Sauve K, Tremblay A. Coordinate regulation of estrogen receptor beta degradation by Mdm2 and CREB-binding protein in response to growth signals. *Oncogene*. 2012 Feb 20. PubMed PMID: 22349818. Epub 2012/02/22. Eng.
101. Sauve K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5793-800. PubMed PMID: 19584281. Epub 2009/07/09. eng.
102. Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*. 2000 Sep 26;39(38):11609-20. PubMed PMID: 10995228. Epub 2000/09/20. eng.
103. Cheng X, Hart GW. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Mar 30;276(13):10570-5. PubMed PMID: 11150304. Epub 2001/01/21. eng.

104. Picard N, Caron V, Bilodeau S, Sanchez M, Mascle X, Aubry M, et al. Identification of estrogen receptor beta as a SUMO-1 target reveals a novel phosphorylated sumoylation motif and regulation by glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol.* 2012 Jul;32(14):2709-21. PubMed PMID: 22586270. Pubmed Central PMCID: PMC3416183. Epub 2012/05/16. eng.
105. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of clinical investigation.* 2006 Mar;116(3):561-70. PubMed PMID: 16511588. Pubmed Central PMCID: PMC2373424. Epub 2006/03/03. eng.
106. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2000 Mar;21(3):427-33. PubMed PMID: 10688862. Epub 2000/02/26. eng.
107. Mourits MJ, GH DEB. Exogenous steroids for menopausal symptoms and breast/endometrial cancer risk. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2006;16 Suppl 2:494-6. PubMed PMID: 17010054. Epub 2006/10/03. eng.
108. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2006 Dec;102(1-5):89-96. PubMed PMID: 17113977. Pubmed Central PMCID: PMC1832080. Epub 2006/11/23. eng.
109. Willey SC, Cocilovo C. Screening and follow-up of the patient at high risk for breast cancer. *Obstetrics and gynecology.* 2007 Dec;110(6):1404-16. PubMed PMID: 18055740. Epub 2007/12/07. eng.
110. Jensen EV BG, Smith S, Kyser K, DeSombre ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. 1971 Dec;34:55-70.
111. Finn R, Dering J, Conklin D, Kalous O, Cohen D, Desai A, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Research.* 2009;11(5):R77. PubMed PMID: doi:10.1186/bcr2419.
112. Meng YG, Han WD, Zhao YL, Huang K, Si YL, Wu ZQ, et al. Induction of the LRP16 gene by estrogen promotes the invasive growth of Ishikawa human endometrial cancer cells through the downregulation of E-cadherin. *Cell research.* 2007 Oct;17(10):869-80. PubMed PMID: 17893710. Epub 2007/09/26. eng.
113. Lin Z, Reierstad S, Huang CC, Bulun SE. Novel estrogen receptor-alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer Res.* 2007 May 15;67(10):5017-24. PubMed PMID: 17510434. Epub 2007/05/19. eng.
114. Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC. Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacological reviews.* 2001 Mar;53(1):25-71. PubMed PMID: 11171938. Epub 2001/02/15. eng.
115. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related cancer.* 2004 December 1, 2004;11(4):643-58.
116. Takimoto GS, Graham JD, Jackson TA, Tung L, Powell RL, Horwitz LD, et al. Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 1999 Apr-Jun;69(1-6):45-50. PubMed PMID: 10418980. Epub 1999/07/27. eng.
117. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *The New England journal of medicine.* 2006 Jan 19;354(3):270-82. PubMed PMID: 16421368. Epub 2006/01/20. eng.

118. Skliris GP, Munot K, Bell SM, Carder PJ, Lane S, Horgan K, et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. *The Journal of pathology*. 2003 Oct;201(2):213-20. PubMed PMID: 14517838. Epub 2003/10/01. eng.
119. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nature reviews Cancer*. 2007 09//print;7(9):713-22.
120. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2011 Aug;11(8):597-608. PubMed PMID: 21779010. Epub 2011/07/23. eng.
121. Green KA, Carroll JS. Oestrogen-receptor-mediated transcription and the influence of co-factors and chromatin state. *Nature reviews Cancer*. 2007 Sep;7(9):713-22. PubMed PMID: 17721435. Epub 2007/08/28. eng.
122. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*. 2000 Mar;52(1):145-76. PubMed PMID: 10699158. Epub 2000/03/04. eng.
123. Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2004 6//;14(3):181-5.
124. Lindley IJD, Westwick J, SL K, . Nomenclature announcement: The chemokines. *Immunol Today* 1993;14:24.
125. Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *Journal of Reproductive Immunology*. 2001 10//;52(1-2):15-33.
126. Mantovani A, Dejana E. Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today*. 1989 Nov;10(11):370-5. PubMed PMID: 2514701. Epub 1989/11/01. eng.
127. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology*. 2007;25:787-820. PubMed PMID: 17291188. Epub 2007/02/13. eng.
128. Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, et al. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001 Apr 15;166(8):5145-54. PubMed PMID: 11290797. Epub 2001/04/06. eng.
129. Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, et al. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*. 1997 Jun 5;387(6633):611-7. PubMed PMID: 9177350. Epub 1997/06/05. eng.
130. Lolis EJFaE. STRUCTURE, FUNCTION, AND INHIBITION OF CHEMOKINES. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. April 2002;42: 469-499.
131. Kohidai L, Csaba G. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine*. 1998 Jul;10(7):481-6. PubMed PMID: 9702410. Epub 1998/08/14. eng.
132. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 1994 1/28//;76(2):301-14.
133. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001 02//print;2(2):102-7.

134. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 02//print;2(2):95-101.
135. Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*. 1998 06/11/print;393(6685):595-9.
136. Dieu M-C, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon J-M, Oldham E, Aït-Yahia S, et al. Selective Recruitment of Immature and Mature Dendritic Cells by Distinct Chemokines Expressed in Different Anatomic Sites. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998 July 20, 1998;188(2):373-86.
137. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*. 1998 Sep;28(9):2760-9. PubMed PMID: 9754563. Epub 1998/10/01. eng.
138. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000 03/23/print;404(6776):407-11.
139. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, et al. CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of leukocyte biology*. 2000 Jul;68(1):1-8. PubMed PMID: 10914483. Epub 2000/07/29. eng.
140. Strieter RM, Gomperts BN. CHEMOKINES, CXC | CXCL12 (SDF-1). In: Geoffrey JL, Steven DS, editors. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. Oxford: Academic Press; 2006. p. 390-4.
141. Jaerve A, Bosse F, Müller HW. SDF-1/CXCL12: Its role in spinal cord injury. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2012 3//;44(3):452-6.
142. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1101-9. PubMed PMID: 9064327. Pubmed Central PMCID: PMC2192798. Epub 1996/09/01. eng.
143. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*. 1995 Aug 10;28(3):495-500. PubMed PMID: 7490086. Epub 1995/08/10. eng.
144. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Dec;106(11):1331-9. PubMed PMID: 11104786. Pubmed Central PMCID: PMC381461. Epub 2000/12/06. eng.
145. Miller RJ, Banisadr G, Bhattacharyya BJ. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *Journal of neuroimmunology*. 2008;198(1):31-8.
146. Woodard LE, Nimmagadda S. CXCR4-Based Imaging Agents. *Journal of Nuclear Medicine*. 2011 November 1, 2011;52(11):1665-9.
147. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine*. 2003 Jan 7;21(1):48-9. PubMed PMID: 12668160. Epub 2003/04/02. eng.
148. Borroni EM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R. Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacology & therapeutics*. 2010 Jul;127(1):1-8. PubMed PMID: 20451553. Epub 2010/05/11. eng.

149. Lazenec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 2010 3//;16(3):133-44.
150. Pelchen-Matthews AS, Nathalie; Klasse, Per J.; Fraile-Ramos, Alberto; Marsh, Mark. Chemokine receptor trafficking and viral replication [Pathogen Subversion Of Cellular Immunity]. *Immunological Reviews*. April 1999;168:33-49.
151. Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):129-34. PubMed PMID: 11175805. Epub 2001/03/29. eng.
152. ROBERT FREDRIKSSON MCLM, LARS-GUSTAV LUNDIN, and HELGI B. SCHIO TH. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. 2003;Vol. 63, No. 6.
153. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, et al. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1998 Feb 1;160(3):1522-31. PubMed PMID: 9570576. Epub 1998/05/07. eng.
154. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Sep 4;273(36):23169-75. PubMed PMID: 9722546. Epub 1998/08/29. eng.
155. Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. CXCR4 and cancer. *Pathology International*. 2010;60(7):497-505.
156. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Mar 5;285(10):7805-17. PubMed PMID: 20048153. Pubmed Central PMCID: PMC2844224. Epub 2010/01/06. eng.
157. Duda DG, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Xu L, Fukumura D, Jain RK. CXCL12 (SDF1 α)-CXCR4/CXCR7 Pathway Inhibition: An Emerging Sensitizer for Anticancer Therapies? *Clinical Cancer Research*. 2011 April 15, 2011;17(8):2074-80.
158. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Dec 20;277(51):49212-9. PubMed PMID: 12370187. Epub 2002/10/09. eng.
159. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer letters*. 2008 Aug 28;267(2):226-44. PubMed PMID: 18579287. Epub 2008/06/27. eng.
160. Miller RJ, Banisadr G, Bhattacharyya BJ. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J Neuroimmunol*. 2008 Jul 31;198(1-2):31-8. PubMed PMID: 18508132. Epub 2008/05/30. eng.
161. Collins AT, Maitland NJ. Prostate cancer stem cells. *European Journal of Cancer*. 2006 6//;42(9):1213-8.
162. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Proliferation*. 2003;36:59-72.

163. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004 11/18/print;432(7015):396-401.
164. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 03/01/print;410(6824):50-6.
165. Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*. 2002 Dec 15;62(24):7203-6. PubMed PMID: 12499259. Epub 2002/12/25. eng.
166. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Jun 13;278(24):21631-8. PubMed PMID: 12690099. Epub 2003/04/12. eng.
167. Luker KE, Luker GD. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer letters*. 2006 7/8;/238(1):30-41.
168. Hall JM, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2003 May;17(5):792-803. PubMed PMID: 12586845. Epub 2003/02/15. eng.
169. Maillot G, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Gratadou L, Schmidt S, Benes V, et al. Widespread estrogen-dependent repression of microRNAs involved in breast tumor cell growth. *Cancer Res*. 2009;69:8332 - 40. PubMed PMID: doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2206.
170. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A. Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor beta by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005 Feb;94(1-3):23-37. PubMed PMID: 15862947. Epub 2005/05/03. eng.
171. Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, et al. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *Journal of biochemical and biophysical methods*. 2007 Apr 10;70(3):481-6. PubMed PMID: 17196660. Epub 2007/01/02. eng.
172. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 Apr;83(8):2496-500. PubMed PMID: 3458212. Pubmed Central PMCID: PMC323325. Epub 1986/04/01. eng.
173. La Rosa P, Pesiri V, Leclercq G, Marino M, Acconcia F. Palmitoylation regulates 17beta-estradiol-induced estrogen receptor-alpha degradation and transcriptional activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2012 May;26(5):762-74. PubMed PMID: 22446104. Epub 2012/03/27. eng.
174. Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *Journal of molecular histology*. 2004 Mar;35(3):233-45. PubMed PMID: 15339043. Epub 2004/09/02. eng.
175. Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, et al. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PloS one*.

- 2011;6(6):e20898. PubMed PMID: 21695171. Pubmed Central PMCID: PMC3112227. Epub 2011/06/23. eng.
176. MacGregor Schafer J, Liu H, Levenson AS, Horiguchi J, Chen Z, Jordan VC. Estrogen receptor alpha mediated induction of the transforming growth factor alpha gene by estradiol and 4-hydroxytamoxifen in MDA-MB-231 breast cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001 Jul;78(1):41-50. PubMed PMID: 11530283. Epub 2001/09/01. eng.
177. Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch J-M, Masiakowski P, Chambon P. Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Research*. 1984 March 26, 1984;12(6):2861-78.
178. Brown AM, Jeltsch JM, Roberts M, Chambon P. Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984 Oct;81(20):6344-8. PubMed PMID: 6593703. Pubmed Central PMCID: PMC391920. Epub 1984/10/01. eng.
179. Allan GF, Hutchins A, Liu X, Clancy J. Induction of the progesterone receptor gene in estrogen target cells monitored by branched DNA signal amplification. *Steroids*. 2001 Sep;66(9):663-71. PubMed PMID: 11546554. Epub 2001/09/08. eng.
180. Elangovan S, Moulton BC. Progesterone and estrogen control of rates of synthesis of uterine cathepsin D. *Journal of Biological Chemistry*. 1980 August 10, 1980;255(15):7474-9.
181. Dubik D, Dembinski TC, Shiu RP. Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1987 Dec 15;47(24 Pt 1):6517-21. PubMed PMID: 3677090. Epub 1987/12/15. eng.
182. Shiug DDRC. Transcriptional Regulation of c-myc Oncogene Expression by Estrogen in Hormone-responsive Human Breast Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263:12705-8.
183. Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, Dauvois S, Parker MG, Truss M, et al. 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene*. 1996 Jun 6;12(11):2315-24. PubMed PMID: 8649771. Epub 1996/06/06. eng.
184. Matthews J, Wihlen B, Tujague M, Wan J, Strom A, Gustafsson JA. Estrogen receptor (ER) beta modulates ERalpha-mediated transcriptional activation by altering the recruitment of c-Fos and c-Jun to estrogen-responsive promoters. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006 Mar;20(3):534-43. PubMed PMID: 16293641. Epub 2005/11/19. eng.
185. Callige M, Richard-Foy H. Ligand-induced estrogen receptor alpha degradation by the proteasome: new actors? *Nuclear receptor signaling*. 2006;4:e004. PubMed PMID: 16604167. Pubmed Central PMCID: PMC1402212. Epub 2006/04/11. eng.