



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Innovation Pharmacologique*

Présentée et soutenue par
Elise MEUNIER

Le 29 septembre 2010

Interrelations entre les protéines Rho et le récepteur des oestrogènes alpha dans des modèles de cancers mammaires

JURY

Monsieur le Professeur G. Favre
Madame le Docteur P. De Cremoux
Monsieur le Docteur M. Renoir
Monsieur le Docteur G. Freiss
Madame le Professeur S. Doisneau-Sixou

Ecole doctorale : *Biologie Santé et biotechnologies*

Unité de recherche : *INSERM U563*

Directeur(s) de Thèse : *Pr. S. Doisneau-Sixou*

Rapporteurs : *Madame le docteur P. de Cremoux*

Monsieur le docteur M. Renoir

Monsieur le docteur G. Freiss

Remerciements

A ma famille et mes amis

A mes parents,

Vous n'avez pas eu le temps de me voir finir le M2R et obtenir la bourse de thèse. Pendant ces années, j'ai réussi à continuer grâce à vous. Lors de ma soutenance, je sais que vous serez parmi nous... Merci.

A ma sœur Anne,

Cela n'a pas toujours été facile entre nous. Merci de m'avoir poussée à continuer et bon courage à Bordeaux.

A mes amis de ma campagne adorée,

A toute l'équipe de St Romain : Patrice, Sophie et leurs deux petites (restez tels que vous êtes !), Laurent, Philippe, Arnaud, Cindy et Sébastien. Et pour les expatriés, de St Antonin Myriam et Cédric. Merci pour votre soutien et pour les bonnes soirées passées ensemble. En espérant que ça continue comme ça pour longtemps !

A Kakou et Sandrine que j'ai appris à mieux connaître et qui sont devenues mes confidentes. Et enfin à Nicolas... Comment trouver les mots pour tout ce que tu m'as apporté ? Je te remercie du fond du cœur (pour les melons bien sûr !☺).

Au laboratoire où j'ai effectué ma thèse

A Sophie,

Merci de m'avoir acceptée pour effectuer le M2R avec toi. Cette année là n'a pas été facile mais nous avons réussi à ce que j'obtienne une bourse pour continuer l'aventure. La « RE team » s'est agrandie peu à peu puis s'est restreinte. Merci pour toutes les compétences que tu m'as apportées (il me semble avoir beaucoup progressé à l'oral grâce à tes conseils). Bonne continuation dans ta nouvelle vie à Munich.

A Florence Dalenc,

La médecin la plus gentille que je connaisse ! Toujours à l'écoute, tu as toujours trouvé un moment pour m'écouter entre deux consultations. Je te souhaite plein de bonnes choses et surtout beaucoup de beaux voyages à effectuer.

A Emilie Malissein,

Pendant 2 ans et demi tu as été à mes côtés dans cette « RE team ». Merci pour tes conseils, ton soutien et ton amitié.

A Caro et Sylvie,

Les deux compères de radiobio qui sont comme des grandes sœurs. Merci pour votre bonne humeur et votre disponibilité. Caro je te donne rendez vous à Lectoure l'année prochaine (voir Marc !). Sylvie, j'espère que tu arriveras à revenir sur Toulouse. Et puis il faut que vous veniez à Rikiki plage !

Au bureau du 3^{ème} étage,

A Olivia (plein de bonheur avec Gaspard) et Sandrine, Anne Cayrel, Judith (prends bien soin de tout le monde, mais je ne m'inquiète pas). Isa Gitlaw pour sa bonne humeur. Et Anthony bien sûr, seul homme de l'équipe radiobio (bon courage !), merci pour l'informatique !

Au reste du troisième,

Bettina (toujours la pêche), Christine T, Elisabeth, Etienne, Ben, Isabelle H (merci pour les conseils en PCR), Isabelle L, Thierry, Magalie, Benoît et Sabrina.

Au quatrième étage,

Fafita, Christine P (bonne continuation pour la thèse), le futur M2R Iotefa et « l'équipe Poirot ».

Au second étage,

L'équipe des Vagners (Stephan, Stephania, Sandra, Loubna, Valérie et Adrien), Patrick (le plus vieux thésard que je connaisse), Claire Giamarchi (avec qui on pestait contre la SNCF !), Isa, Anne P, Anne Casanova (merci pour votre gentillesse et vos conseils à toutes les 3), Aurélien Olivier, Nelly, Cathy et Delphine.

Au bureau du second étage,

Alexis (Mr Informatique), Audrey, Rémi (tu m'auras plus en cous quelle chance !), Claire Marty et bien sûr Emilie qui est devenue une vraie amie au fil des années (promis je viens à Luzech cette année, si tu finis d'écrire ta thèse !).

A tous ceux qui sont partis,

Nico (bientôt de retour), Guillaume, Anne C, Pierre, Gérard, Laura, Flo (bonne route à Bordeaux avec Cyril, je n'oublierais pas notre séjour au Canada !), Jennifer, Yann (tu as enfin fini médecine ?), François, Marlène, Emilie P, Sam, Marine et tout les autres.

A l'équipe du pôle de physiologie animale,

Merci pour ces 3 années de monitorat.

A Manolita, pour son aide pour les TP et le petit café de 10h. A Claude et Virginie, merci de m'avoir fait confiance en me laissant des L3 et M1 (le TP aorte je m'en souviendrais ! le rose porte chance). A Anne, Philippe (merci de m'avoir fait confiance pour le CNAM), Michelle, Valérie... Tous des maîtres de conf ou professeur très sympas. Et bien sûr aux moniteurs avec qui j'ai fait TP et avec qui j'ai également bien rigolé : Fred, Sandrine, Julien, Claire, Cédric, Thibault, Nico, Camille, Rodolphe, Rana...

A ceux avec qui j'ai collaboré,

L'équipe d'Hélène Richard-Foy puis de Kerstin au LBME-CNRS (Sylvain, Kerstin, Claire et Stéphanie) pour leur aide.

Thomas Filleron (ICR) pour les statistiques.

Françoise Lenfant (INSERM U858) pour les souris invalidées pour le récepteur des œstrogènes.

Vincent Cavailès (INSERM U896) pour la partie HDAC1.

Au jury de thèse,

Au Professeur Gilles Favre,

Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire durant ces années. L'ambiance et les personnes qui s'y trouvent m'ont fait passer d'agréables moments.

Au Docteur Michel Renoir,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Au Docteur Gilles Freiss,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Je vous ai souvent croisé lors de manifestations sur le cancer du sein. Je ne vous ai pas rencontré personnellement mais je suis de près ce qui se passe à Montpellier.

Au Docteur Patricia de Cremoux,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapportrice.

Avant Propos

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans les cancers du sein. La plupart des cancers du sein expriment les récepteurs hormonaux (RE et RP) et sont donc traités par hormonothérapie. Parmi les traitements les plus courants, on peut citer les anti-œstrogènes (dont le plus connu est le tamoxifène) qui vont se fixer par compétition sur le récepteur des œstrogènes (RE) et les anti-aromatases, préconisés chez les femmes ménopausées afin d'éliminer toute source d'œstrogènes endogènes. Toutefois, l'apparition de résistances à ces traitements impose la nécessité de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux précédents de l'équipe au sein de l'INSERM U563 montrent l'implication des protéines Rho GTPases dans la transcription dépendante du RE α dans des modèles de cancers mammaires. Ces protéines appartenant à la superfamille Ras et qui sont connus pour leur rôle sur le cytosquelette, jouent également un rôle dans la cancérogénèse mammaire.

L'objectif principal de mon travail a été d'identifier les effets spécifiques de chaque protéine Rho : RhoA, B et C, dans la transcription dépendante du RE α et de déterminer les mécanismes impliqués.

Je présenterais les résultats de ma recherche sous forme de trois articles : l'un soumis pour publication, les deux autres en préparation. Le premier article récapitule les résultats obtenus sur l'expression de RhoB dans des tumeurs de patientes traitées ou non au tamoxifène.

Le second travail met en évidence et compare les effets de RhoA et RhoC sur le recrutement du RE α sur 3 gènes cibles, la transcription dépendante du RE α et l'expression du RE α .

Enfin, dans une troisième partie, nous avons déterminé l'existence d'un dialogue entre RhoB et le corépresseur HDAC1.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	6
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	12
RESUME EN FRANCAIS.....	13
SUMMARY.....	14
ABREVIATIONS.....	15
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	16

I. Cancer du sein

1. Définition.....	17
2. Epidémiologie.....	17
3. Classification.....	18
4. Facteurs de risque.....	23
a. Sexe.....	23
b. Age.....	23
c. Prédisposition génétique.....	23
d. Imprégnation œstrogénique.....	24
5. Cancérogenèse mammaire.....	25
a. Histoire naturelle de la tumeur.....	25
b. Anomalies génomiques, moléculaires et épigénétiques.....	25
6. Facteurs pronostics et prédictifs.....	27
7. Traitements des cancers du sein.....	28
a. Chirurgie.....	29
b. Radiothérapie.....	29
c. Chimiothérapie.....	30
d. Hormonothérapie.....	32
e. Autres thérapies ciblées.....	35

II. Voies de signalisations œstrogéniques

1. Les œstrogènes endogènes.....	37
2. Les œstrogènes exogènes.....	38
3. Structure et localisation des RE.....	39
a. Le récepteur des œstrogènes α	40
b. Le récepteur des œstrogènes β	42
4. Les voies de signalisation œstrogéniques.....	45
a. Les différentes voies de signalisation.....	45
b. Les cofacteurs du RE α	52
5. Modifications post-traductionnelles et devenir du RE α	55
a. Phosphorylation.....	55
b. Acétylation.....	56
c. Sumoylation.....	57
d. Ubiquitination.....	57

III. Les GTPases de la famille Rho

1. Définition et structure des protéines Rho.....	58
a. Définition.....	58
b. Structure des protéines Rho.....	60
2. Expression.....	62
3. Localisation subcellulaire.....	62
4. Modifications post-traductionnelles.....	63
5. Cycle d'activation/inactivation des petites GTPases Rho.....	65
a. Les guanosine exchange factors : GEFs.....	65
b. Les GTPases activating proteins : GAPs.....	66
c. Les Guanosine dissociation inhibitor : GDIs.....	67
6. Effecteurs.....	70
7. Fonctions.....	70

a. GTPases Rho et cytosquelette d'actine.....	70
b. GTPases Rho et trafic cellulaire.....	71
c. GTPases Rho, transcription, prolifération cellulaire.....	72
8. GTPases Rho et oncogenèse.....	73
a. GTPases Rho et cancers.....	73
b. GTPases Rho et cancers du sein.....	74
c. Régulateurs des Rho et cancer du sein.....	77
9. Les inhibiteurs de Farnésyl (Farnesyl Transferases Inhibitors ou FTIs).....	79
a. Les inhibiteurs de farnésyl (FTIs).....	79
b. FTIs et cancers.....	79

IV. La petite GTPase RhoB

1. Régulation de l'expression de RhoB.....	81
a. Le cycle cellulaire.....	81
b. Les facteurs de croissance.....	82
c. Les GTPases Rho.....	82
d. Les stress génotoxiques.....	82
e. Les glucocorticoïdes.....	83
2. Modifications post-traductionnelles de RhoB.....	83
a. La prénylation.....	83
b. La palmitoylation.....	84
3. Régulation de l'activation de Rho.....	84
a. RhoB et GEFs.....	84
b. RhoB et GDIs.....	85
4. Effecteurs de RhoB.....	86
5. Fonctions biologiques et voies de signalisation.....	87
a. RhoB et cytosquelette d'actine.....	87
b. RhoB et cycle cellulaire.....	88
c. RhoB et trafic intracellulaire.....	88
d. RhoB, adhérence et migration.....	89
e. RhoB et réponse au stress.....	89
f. RhoB et réponse transcriptionnelle.....	91
g. RhoB et oncogenèse.....	92

V. Les Histones Décacétylases (HDACs) et cancers du sein

1. Les HDACs.....	99
2. Les inhibiteurs d'HDAC.....	100
3. Les inhibiteurs d'HDAC et cancers du sein.....	102
a. HDACi et cancers du sein.....	102
b. HDACi et modulation de l'expression des RE.....	103
c. Molécules en cours d'essai clinique.....	106

OBJECTIFS DE LA THESE.....	108
-----------------------------------	------------

RESULTATS.....	110
-----------------------	------------

I. RhoB modifie les réponses aux œstrogènes dans des cellules de cancers du sein en influençant l'expression du récepteur des œstrogènes alpha.....	111
--	------------

II. RhoA et RhoC modulent différemment le recrutement du REα et la transcription associée selon les gènes cibles, dans les cellules MCF-7.....	115
---	------------

III. RhoB contrôle l'expression de HDAC1 <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>.....	119
--	------------

CONCLUSION GENERALE.....	123
---------------------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE.....	128
---------------------------	------------

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification moléculaire des cancers du sein (d'après Sorlie, 2001).....	21
Figure 2 : Effets des œstrogènes sur l'organisme (d'après Grüber, 2002).....	37
Figure 3 : Structure et production des œstrogènes et structure des phyto-œstrogènes (d'après Grüber, 2002).....	38
Figure 4 : Représentation schématique de la structure des domaines fonctionnels des RE α et RE β	43
Figure 5 : Les différentes voies de signalisation œstrogénique.....	46
Figure 6 : Les sites de phosphorylation du RE α	56
Figure 7 : La famille des GTPases Rho (d'après Boueux, 2007).....	59
Figure 8 : Schéma représentant la structure générale des petites GTPases.....	61
Figure 9 : Modifications post-traductionnelles des protéines Rho au niveau COOH terminal..	64
Figure 10 : Cycle d'activation des petites GTPases de la famille des protéines Rho.....	69
Figure 11 : Objectifs de la thèse.....	109

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification TNM anatomo-pathologique des cancers du sein.....	18
Tableau 2 : Classification SBR.....	19
Tableau 3 : Caractéristiques des différents sous types de tumeurs du sein (d'après Herchkowitz, 2007).....	22
Tableau 3 : Principaux médicaments antimitotiques dans les cancers du sein.....	31

Résumé

L'hormonothérapie est recommandée dans environ deux tiers des cancers du sein exprimant le récepteur des œstrogènes (RE) et/ ou le récepteur de la progestérone (RP). Cependant, il y a apparition systématique de résistances qui imposent la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Les œstrogènes agissent *via* le RE α mais il a été démontré des interrelations majeures entre le RE α et la voie de facteurs de croissance en particulier avec les protéines Rho. L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer s'il existe un dialogue entre le RE α et les protéines RhoA, B et C, les éventuels mécanismes mis en jeu et l'implication dans la tumorigenèse mammaire.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de mettre en évidence que RhoB est un élément clé de la régulation de l'expression du RE α et du RP. Pour cela, nous avons utilisé des modèles cellulaires, animaux et des tumeurs de patientes. En effet, une régulation réciproque positive existe entre ces deux protéines et RhoB apparaît comme ayant un rôle de pro-oncogène dans des cellules de cancers du sein hormonodépendantes, contrairement à son rôle connu de suppresseur de tumeur pour d'autres cancers. De plus, RhoB modifie clairement les activités transcriptionnelles liées au RE α et l'équilibre des cofacteurs, y compris du RE α lui-même, recrutés sur le promoteur de RP.

Dans un second volet de ce travail, nous nous sommes concentrés sur l'influence de RhoA et de RhoC sur les activités du RE α . Nous avons pu démontrer, dans des cellules MCF-7, que RhoA et RhoC modifient également le recrutement de RE α sur les promoteurs de différents gènes cibles du RE α mais sans corrélation avec les modulations d'activités transcriptionnelles associées. A l'inverse de RhoB, RhoA et RhoC diminuent l'expression du RE α mais selon des mécanismes distincts.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons mis en évidence et analysé la régulation qu'exerce RhoB sur le corépresseur HDAC1 dans les cellules de cancers du sein, indépendamment du statut hormonal.

L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de montrer que malgré leur très forte homologie, RhoA, RhoB et RhoC ont toutes 3 des rôles, mais différents, sur l'expression et les effets transcriptionnels du RE α dans les cellules de cancers du sein. De plus, l'importance de RhoB comme agent pro-prolifératif dans des cellules mammaires hormonodépendantes est un axe majeur à développer.

Summary

Hormone therapy is recommended in approximately two thirds of breast cancers which express the Estrogen Receptor alpha (ER α) and/or Progesterone Receptor (PR). Nevertheless, there are many cases of systemic resistance to the treatment that impose to find new therapeutic targets. Estrogens act *via* ER α but cross-talks between ER α and growth factor pathways have been demonstrated, especially with Rho proteins. The aim of this study was to determine the cross-talks existing between ER α and the RhoA, B and C proteins, the mechanisms of these cross-talks and their involvement in mammary tumorigenesis.

First of all, our results showed that RhoB controls ER α and PR expressions. For this, we used mammary cell lines, RhoB deficient mice and tumors from patients. A positive regulation loop has been demonstrated between RhoB and ER α . RhoB appears then to be pro-oncogenic in hormone-dependant mammary tumors cells, inversely to its usual role of tumor suppressor gene for other cancer locations. Moreover our results clearly show that RhoB controls ER α transcriptional activities and the recruitment of its cofactors (including ER α itself) on PR promotor.

In a second part, we analyzed the effects of RhoA and RhoC on ER α activities. RhoA and RhoC modify too ER α recruitment on 4 of its target genes, but without any correlation with the observed modulations of transcription. Opposite to RhoB, RhoA decreases ER α expression whereas RhoC has no effect.

In a third part, we identified another reciprocal positive regulation between RhoB and HDAC1. The first results obtained *in vitro* have been confirmed in RhoB deficient mice.

Taken together, these results suggest that in spite of their sequence homology, RhoA, B and C all act, but in different manners, on ER α expression and transcriptional activities in mammary

cancer cells. Furthermore, the importance of RhoB as proliferative agent in mammary hormone dependant cancer cells is a major research area to consider

ABREVIATIONS

AA(s) :	Anti-aromatase(s)
AE :	Antiœstrogènes
AF-1 :	Domaine d'activation de la transcription 1
AF-2 :	Domaine d'activation de la transcription 2
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
CoA :	Coactivateurs
CoR :	Corépresseurs
DBD :	Domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain)
E ₂ :	17-β-œstradiol
EGF :	Facteur de croissance épithélial (Epidermal Growth Factor)
EGF-R :	Récepteur du facteur de croissance épithélial (Epidermal Growth Factor Receptor)
ERE :	Éléments de réponse aux œstrogènes (Estrogen Responsive Element)
FISH :	Hybridation <i>in situ</i> avec fluorescence (Fluorescence <i>In situ</i> Hybridation)
HAT :	Histone acétyl transférase
HDAC :	Histone déacétylase
HDACi :	Inhibiteur d'HDAC
HMT :	Histone méthyl transférase
IGF :	Facteur de croissance de l'insuline (Insulin Growth Factor)
IGFBP :	Protéine de liaison au facteur de croissance de l'insuline (Insulin Growth Factor Binding Protein)
LBD :	Domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain)
NLS :	Séquence de localisation nucléaire (Nuclear Localisation Sequence)
RCPG :	Récepteur couplé aux protéines G
RE :	Récepteur des œstrogènes
RH :	Récepteurs hormonaux
RN :	Récepteurs nucléaires
RP :	Récepteur de la progestérone
SERD :	Régulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes (Selective Estrogen Receptor Downregulator)
SERM :	Modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes (Selective Estrogen Receptor Modulator)
VPA :	Acide valproïque

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les cancers du sein

1. Définition

Les cancers du sein se définissent comme une prolifération maligne de cellules épithéliales bordant les canaux ou les lobules du sein appelés respectivement carcinomes canaux ou lobulaires. S'il y a une effraction de la membrane basale, séparant l'épithélium du tissu conjonctif, ces carcinomes sont dits infiltrants. Dans le cas contraire, ils sont dits *carcinome in situ* ou intra-canaux). Ils possèdent ou non un potentiel métastatique.

2. Epidémiologie

Depuis plusieurs années, le cancer du sein est devenu un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés, nécessitant la mise en place d'actions de prévention, de dépistage (mammographie à partir de 50 ans à renouveler tous les deux ans en France, selon les recommandations du plan Cancer) et de recherche de nouvelles thérapies.

A ce jour, il représente le cancer féminin le plus fréquent : il affecte une femme sur 9. En 2008, 1.050.000 cas ont été diagnostiqués à travers le monde avec environ 400.000 décès la même année. En 2008 toujours, 54.000 nouveaux cas ont été détectés en France et 11.200 décès dus aux cancers du sein ont été recensés. Ces données épidémiologiques affichent une augmentation de l'incidence avec une tendance à la baisse depuis les années 2000 et une quasi-stabilité de la mortalité depuis plus de 20 ans : ces résultats proviennent sans doute d'un dépistage plus précoce et d'une meilleure prise en charge. Tous stades confondus, plus de 85% des patientes survivent 5 ans après le diagnostic.

3. Classification

Les cancers du sein, comme d'autres tumeurs dites solides, peuvent être classées :

- en différents stades (classification TNM). Cette classification prend en compte la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastases à distance (M) [1].

Tableau 1 : Classification TNM anatomo-pathologique des cancers du sein

T0	Pas de tumeur palpable
Tis	Carcinome <i>in situ</i>
T1	Taille < 2 cm
T2	Taille entre 2 et 5 cm
T3	Taille > 5cm
T4	Extension à la paroi ; extension à la peau ; extension aux deux ; inflammatoire
N0	Pas de ganglion envahi
N1	1 à 3 ganglions envahis
N2	4 à 9 ganglions envahis
N3	- soit 10 ou plus ganglions envahis - soit sus-claviculaire
M0	Pas de métastase à distance
M1	Métastase

- en différents grades (classification SBR). Cette classification permet de déterminer indirectement un indice d'activité proliférative à l'aide d'un grade histopronostique

appelé SBR ou grade de Scarff, Bloom et Richardson [2]. Ce grade permet, en donnant un score entre 1 et 3 à trois éléments histologiques d'un cancer infiltrant, d'en déterminer le grade qui est établi entre I et III.

Tableau 2 : Classification SBR

Pauvreté en structures glandulaires bien définies	Score 1, 2 ou 3
Irrégularité des noyaux	Score 1, 2 ou 3
Richesse des noyaux	Score 1,2 ou 3

Grade	Score total
I	3 à 5
II	6 et 7
III	8 et 9

Plus le grade est élevé, plus la tumeur est agressive et de mauvais pronostic.

Ces deux classifications permettent avec d'autres paramètres biologiques tels que la présence ou l'absence de récepteur des œstrogènes alpha (RE α), de récepteur à la progestérone (PR) ou la surexpression de la protéine p185^{erbB2}, d'établir un pronostic et un traitement approprié. Les avancées de la biologie du cancer ainsi que les progrès techniques tels que les analyses génomiques et transcriptomiques confirment que le cancer du sein est une maladie très hétérogène avec une diversité dans la réponse aux traitements, expliquant les différences dans l'évolution de la maladie pour des populations de patients diagnostiqués et traités à des stades identiques.

Les premiers travaux de l'équipe de C. Pérou et T Sorlié, identifiaient 6 sous-groupes de cancers du sein selon leur profil d'expression génique [3] (Figure 1), avec l'identification de

deux groupes principaux : un groupe caractérisé par une expression faible (ou nulle) du RE (tumeurs dites « RE négatives ») et l'autre par une expression plus ou moins forte de celui-ci (tumeurs dites « RE positives » ou luminales).

Le groupe des « RE négatives » comprend :

- i. les tumeurs dites basales ; correspondant le plus souvent aux tumeurs dites « triples négatives » après analyse des récepteurs RE, RP et p185^{erbB2} par immunohistochimie (RE, RP et p185^{erbB2} négatives).
- ii. les tumeurs p185^{erbB2} positives (par amplification du gène *erbB2*).
- iii. les tumeurs dites « normales like ».

Le groupe des luminales/RE positives sont considérées comme potentiellement hormonosensibles et inclut les tumeurs luminales A, B et C. Les luminales A sont de grade I (et expriment fortement les récepteurs hormonaux (RH) alors que les luminales B/C sont moins bien différenciées, ont un index de prolifération plus important et expriment les RH en moindre quantité.

Cette classification génomique a clairement identifié des courbes de survie de patientes très différentes selon le sous-groupe de tumeur, avec, en particulier une survie sans récurrence bien meilleure pour les tumeurs luminales A par rapport aux autres groupes.

En 2007, une nouvelle classification est apparue (Herschkowitz, *Genome Biology*, 2007). A partir de 13 échantillons murins, il a été identifié 5 sous groupes (luminales A, luminales B, tumeurs surexprimant *erbB2*, basal-like et claudin low). Les caractéristiques de ces sous groupes sont repris dans le tableau 4.

Sous groupes	Expression des RH	Expression de erBb2	Particularités cliniques et/ou anatomopathologiques
Luminales A	+++	-	Grade I- très bon pronostic (très) hormonosensibles
Luminales B	++	-	Index prolifération élevé Pronostic intermédiaire +/- hormonosensibles
Surexprimant erBb2	- ou +	+++	n'expriment pas toujours les récepteurs hormonaux Mauvais pronostic mais possibilité de thérapies ciblées antiHER2
Basal-like	--	--	Haut grade (grade III), mauvais pronostic Immunohistochimie : parfois EGFR+, CK5/6+ Fréquemment mutées pour p53 Souvent de phénotype « BRCA1-ness »
Claudin-low	--	--	Sous catégorie de tumeurs triple négatives. Enrichies en marqueurs de transition EMT (epithelial-to-mesenchymal transition) Mauvais pronostic Différenciation médullaire ou métaplasique fréquente

Tableau 3 : Caractéristiques des différents sous types de tumeurs du sein (d'après Herschkowitz, Genome Biology, 2007).

4. Les facteurs de risque

a. Sexe

Le cancer du sein touche essentiellement les femmes. Seulement 1% des hommes sont concernés. Les traitements sont les mêmes pour les hommes et les femmes.

b. Age

La probabilité de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. Environ deux tiers sont diagnostiqués chez des femmes âgées de plus de 55 ans et 10% chez les femmes de moins de 40 ans.

L'âge jeune (< à 35 ou 40 ans selon les séries) est considéré comme un facteur de mauvais pronostic indépendant dans de nombreuses séries : il favorise le risque de rechute à distance mais aussi le risque de rechute loco-régionale. [4 , 5] Une étude de Canello et son équipe [6] effectuée sur 2970 patientes montre que chez les patientes jeunes (<35ans), il y a moins de tumeurs de type luminal A et plus de triples négatives. L'étude Carolina sur le cancer du sein effectuée sur des Afro-américaines, montre également que les lumorales A et B sont plus fréquentes chez les patientes ménopausées que chez celles qui ne le sont pas [7] . A l'inverse, les tumeurs triples négatives sont plus fréquentes chez les femmes de moins de 40 ans [8].

c. Predisposition génétique

Environ 5% des cancers du sein sont d'origine génétique. Il existe principalement deux gènes de prédisposition au cancer du sein : le gène *BRCA1*, gène de grande taille, localisé au niveau

du chromosome 17 qui code une protéine de 1863 acides aminés et le gène *BRCA2* présent sur le chromosome 13 qui code lui une protéine de 3418 acides aminés [9]. Ces deux gènes sont dits suppresseurs de tumeurs : leur mutation (un seul allèle suffit) peut augmenter le risque de cancer du sein. *BRCA2* semble en plus favoriser les cancers de la prostate et du pancréas, par rapport au risque de la population globale. La fréquence des personnes ayant cette mutation est environ de 1 sur 420, soit environ 35.000 femmes porteuses âgées de 30 à 69 ans en France. Avec les mutations de *BRCA1*, le risque de développer un cancer du sein avant 70 ans est de 65% alors que pour *BRCA2*, il est de 35%. Ces mutations sont héréditaires [10].

En dehors de ce contexte, une prédisposition familiale est observée dans 20 à 25% des cas.

D'autres gènes suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein existe tels que *PALB2* et *BRIP1*. Leurs mutations est associée à un risque deux fois plus important de développer un cancer du sein. Contrairement à *BRCA1* et *BRCA2*, la perte de *PALB2* et *BRIP1* n'est pas associé à un âge jeune au moment du diagnostic (Rahman, Nat Genet, 2007)

d. Imprégnation œstrogénique

L'âge des premières règles peut avoir un impact sur la survenue du cancer du sein. En effet, le risque s'accroît avec leur précocité.

Le risque de cancer du sein augmente également de façon importante avec le moment d'apparition de la ménopause. Une période d'activité génitale longue augmente donc les risques de cancer du sein.

L'âge de survenue de la première grossesse peut avoir une importance car le risque diminue si elle survient avant 30 ans, mais il augmenterait pour un âge supérieur à 35 ans [11].

Enfin, le traitement hormonal substitutif de la ménopause peut entraîner, lorsqu'il est prolongé, une augmentation des risques de cancer du sein [12].

5. Cancérogenèse mammaire

La cancérogenèse est un processus qui conduit à la transformation progressive de cellules normales en cellules malignes. Les modifications génétiques associées à cette transformation maligne sont souvent des mutations qui produisent une augmentation de la fonction du gène (oncogène) ou une perte de fonction (anti-oncogènes ou suppresseur de tumeur).

a. Histoire naturelle de la tumeur

L'oncogénèse se déroule en plusieurs étapes :

- initiation cancéreuse : mutations au niveau de l'ADN non réparé.
- transformation cellulaire par acquisition des cellules de la capacité à proliférer (stade de promotion cellulaire)
- prolifération clonale.

b. Anomalies génomiques, moléculaires et épigénétiques

Les anomalies moléculaires les plus fréquentes à l'origine du développement tumoral mammaire sont représentées par des amplifications d'oncogènes codant majoritairement des facteurs de croissance et leurs récepteurs. En matière de cancer mammaire, les amplifications principales concernent :

-***c-erbB2*** : codant p185^{erbB2}, protéine de la famille des récepteurs de l'EGF.

-***c-myc*** : codant la protéine Myc nucléaire susceptible d'augmenter la transcription et qui intervient aussi dans la régulation de l'apoptose.

- ***ccnd1*** : codant la cycline D1 qui régule la transition G1/S du cycle cellulaire.

Ces amplifications sont observées dans plus de 15% des cas.

Des inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p53*, *Rb*, *P16*, *PTEN*, *BRCA1* et *BRCA2* sont également fréquentes. Par exemple, environ 20 à 40% des cancers du sein présentent une mutation du gène *p53*. Celle-ci intervient au niveau du cycle cellulaire, en le bloquant en cas de lésions du matériel génétique, pour permettre à la cellule de réparer les dommages génomiques avant sa division. Enfin, lorsque les lésions sont trop importantes, *p53* peut induire un phénomène d'apoptose.

Il est estimé également que moins de 5% des tumeurs mammaires présentent une mutation de *p21ras* [13] alors que celle-ci est plus fréquente dans les autres tumeurs solides. Par contre, la surexpression de *p21ras* sauvage est souvent retrouvée dans les cancers du sein. Les protéines Rho qui font partie de la famille Ras ne sont pas mutées dans les cancers mammaires [14] mais elles sont souvent surexprimées ou hyperactives [15]. Nous reprendrons la description et l'implication de ces protéines dans la cancérogenèse mammaire dans la troisième partie de cette introduction.

Depuis quelques années, les modifications épigénétiques sont de plus en plus étudiées notamment dans les cancers du sein. Il est reconnu que l'hyperméthylation du promoteur d'un gène sur des îlots CpG et l'augmentation de l'activité méthyltransférase, réprime la transcription de ce gène (« mise en silence »). Ceci est notamment observé dans les cancers pour des gènes suppresseurs de tumeurs [16]. Dans les cancers du sein, l'hyperméthylation du promoteur concerne des gènes qui inhibent le cycle cellulaire (*p16 RASSF1A*), des gènes de réparation de l'ADN (*BRCA1*), des gènes pro-apoptotiques (*HOXA5*, *TMS1*), des enzymes métaboliques (*GSTP1*) et des gènes impliqués dans l'adhérence cellulaire et la formation de métastases (*CDH1*, *CDH13*) [17]. De plus, de nombreuses études montrent que la région 5' du gène *ESR1* qui code le RE α est méthylé dans des cellules RE négatives [18]. D'autres données montrent qu'il y a une coopération entre la méthylation de l'ADN et la déacétylation d'*ESR1*

dans la mise en silence de ce gène [19]. Ces auteurs ont montré une intervention de DNMT1 et HDAC1 et 2 dans ce phénomène. Nous reviendrons sur ces modifications épigénétiques dans la partie IV de cette revue générale.

6. Facteurs pronostics et prédictifs

En pratique clinique, il est aujourd'hui clairement admis que l'expression des RH, actuellement analysée par immuno-histochimie, est un paramètre à prendre en compte sous deux aspects : pronostiques et thérapeutiques. 60 à 70% des cancers du sein expriment le RE α et/ou le RP. L'absence d'expression de ces RH est associée à un pronostic plus péjoratif [3]. Sur le plan thérapeutique, les RH sont corrélés, en premier lieu, à la réponse à l'hormonothérapie : environ 60% des tumeurs exprimant le RE alpha, répondent initialement aux traitements hormonaux et en particulier au tamoxifène, contre moins de 10% de réponse en l'absence des RH.

En parallèle des RH, l'oncogène *erbB2* et la protéine qu'il code p185^{erbB2} jouent un rôle important dans 18 à 20% des cas de cancer du sein [20] La surexpression de cette protéine, détectée en immuno-histochimie et/ou l'amplification du gène *erbB2*, détectée par FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridation) est le témoin d'un pronostic plus péjoratif et d'une moindre sensibilité à toute hormonothérapie.

Des travaux cliniques rétrospectifs et prospectifs ont déjà montré l'intérêt de μ PA/ PAI-1 en tant que facteur pronostic des cancers du sein. La sérine protéase μ PA et son inhibiteur PAI-1 sont deux protéines impliquées dans les interactions entre la tumeur et son microenvironnement. Le facteur μ PA active un ensemble de pro-protéases impliquées dans le phénomène invasif (métalloprotéases, cathepsines à l'exception de la cathepsine D) alors que PAI-1 est un marqueur indirect de l'apoptose [21], [22]. Chez les patientes atteintes d'un cancer du sein sans atteinte ganglionnaire, les biomarqueurs μ PA et PAI-1 ont également une valeur prédictive de réponse à une chimiothérapie mais avec un niveau intermédiaire donc qui reste à confirmer (essai en cours).

De nouveaux moyens de prédire le pronostic font actuellement l'objet d'études cliniques prospectives à large échelle : Oncotype DXTM et MammaPrint®. Oncotype DXTM permet l'analyse simultanée par PCR de l'ARNm correspondant à l'expression de 21 gènes à partir de tissu inclus en paraffine. Le test Oncotype DXTM est un test qui permet de prédire la réponse au tamoxifène.

MammaPrint® (signature génomique d'Amsterdam) permet l'analyse simultanée par puce à ADN de l'expression de 70 gènes à partir de tissu tumoral congelé. MammaPrint® permettrait de classer en haut risque et bas risque les patientes avec ou sans atteinte ganglionnaire dont la taille de la tumeur est inférieure ou égale à 5 cm (stade I ou II). MammaPrint® pourrait donc être un facteur pronostic pur car les patientes qui effectuent ce test ont reçu un traitement locorégional, sans traitement systémique (hormonothérapie ou chimiothérapie) [23].

A ce jour, ces deux tests ne sont pas utilisés en pratique clinique quotidienne (en dehors d'une étude clinique prospective) pour aider à la décision thérapeutique, en raison d'un niveau de preuve insuffisant (rapport inca 2010).

7. Traitements des cancers du sein

Les principaux traitements sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Certaines molécules sont couramment utilisées en clinique, d'autres font encore l'objet d'études cliniques prospectives. Devant l'apparition de résistances à certains de ces traitements médicaux, la recherche actuelle se tourne vers des thérapies ciblées qui font l'objet de nombreux essais cliniques.

Il faut distinguer les traitements locaux et locorégionaux (chirurgie et radiothérapie) des traitements systémiques visant à agir non seulement au niveau de cellules résiduelles mais aussi au niveau des micro-métastases ou des métastases (chimiothérapie, hormonothérapie et thérapies ciblées).

a. Chirurgie

La chirurgie varie en fonction du stade, de la localisation dans le sein et du potentiel évolutif de la tumeur. Il existe deux situations : la mastectomie radicale, qui permet d'enlever la glande mammaire dans sa totalité et la mastectomie partielle qui correspond à l'exérèse d'une partie seulement de la glande mammaire. Celle-ci offre des possibilités de séquelles cosmétiques et psychologiques moins importantes. De plus, une exploration du creux axillaire (procédure du ganglion sentinelle ou évidement) est aussi réalisée pour disposer d'un facteur pronostic important qui est le statut ganglionnaire axillaire. La technique des ganglions sentinelles permet de limiter la réalisation d'un évidement axillaire complet et donc ses conséquences potentiellement invalidantes pour les patientes (en particulier, risque de lymphœdèmes). La chirurgie est classiquement la première ligne de prise en charge thérapeutique mais dans certaines situations elle peut succéder à une chimiothérapie, à une hormonothérapie et/ ou à radiothérapie qui sont dites « néoadjuvante ».

b. Radiothérapie

La radiothérapie réduit le risque de rechute loco-régionale. Elle peut être utilisée de deux manières :

- après la chirurgie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles (le plus fréquent) :
radiothérapie adjuvante
- avant la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur : radiothérapie néo-adjuvante.

c. Chimiothérapie

Les tumeurs du sein sont considérées comme des maladies sensibles aux chimiothérapies. Les molécules cytotoxiques inhibent la prolifération des cellules et en particulier des cellules tumorales. La chimiothérapie peut être utilisée en situation adjuvante ou néoadjuvante et en situation métastatique. Elle sera, si possible, associée à une thérapie ciblée.

Dans l'objectif de réduire les résistances précoces, il est utilisé des associations de cytotoxiques possédant des mécanismes d'action différents et si possible avec des toxicités non cumulatives. En termes de chimiothérapie conventionnelle, les protocoles contenant une antracycline comme le protocole FEC (5 fluoro-uracile, épirubicine, cyclophosphamide) ou bien un taxane (paclitaxel ou docétaxel) sont les plus utilisés.

Tableau 4 : Principaux médicaments antimétabolites utilisés dans les cancers du sein

Classe pharmacologique	DCI	Nom de spécialité
Taxanes	Docétaxel Paclitaxel	Taxotère ® Taxol ®
Antracyclines	Epirubicine Doxorubicine	Farmorubicine ® Adriblastine ®
Antracènediones	Mitoxantrone	Novantrone ®
Alcaloïdes de pervenche	Vinorelbine	Navelbine ®
Agents alkylants	Cyclophosphamide Thiotepa	Endoxan ® Thiotepa ®

Antimétabolites	Capécitabine Méthotrexate 5 Fluoro-uracile	Xeloda ® Ledertrexate ® 5 Fluoro-uracile ®
-----------------	--	--

d. Hormonothérapie

En 1896, Beatson remarqua une régression d'une tumeur mammaire primitive en réponse à une ovariectomie chez des femmes préménopausées : ce fût la première observation que les cancers du sein pouvaient être hormonodépendants. L'identification en 1966 du RE α par Jensen permit d'avoir un outil pour décrire la spécificité d'action des œstrogènes sur son site d'action [24]. Celui-ci fut identifié comme cible pour le développement de nouveaux médicaments pour le traitement et la prévention des cancers du sein.

L'hormonothérapie débuta seulement dans les années 1970 avec un anti-œstrogène: le tamoxifène (Nolvadex ®), encore aujourd'hui très utilisé.

En clinique, l'hormonothérapie peut agir à 3 niveaux :

- l'axe hypothalamo-hypophysaire : ce type d'hormonothérapie est prescrit à des femmes préménopausées. Ce sont des analogues de la LH-RH,
- par compétition avec le RE α en utilisant des anti-œstrogènes. Ce sont des SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator) et les SERDs (Selective Estrogen Receptor Downregulator),
- par l'inhibition des aromatasés chez les patientes ménopausées. Ce sont les anti-aromatases (AAs).

1. Les agonistes de la LH-RH :

Ils représentent un des moyens pour réduire la production d'œstrogènes endogènes avant la ménopause. Ils entraînent une suppression ovarienne analogue à la ménopause en abaissant en quelques semaines le taux d'œstradiol circulant à une valeur négligeable (castration chimique). Leur action est réversible à l'arrêt. Actuellement, trois molécules sont utilisées en pratique courante : la gosérelina (Zoladex ®), la triptoréline (décapeptyl ®) et la leuproréline (Enantone ®).

2. Les anti-œstrogènes : modulateurs sélectifs de l'activation du RE α (SERMs)

→ Le tamoxifène (Nolvadex ®) :

Pendant plus de 35 ans, le tamoxifène, SERM de première génération, a été le chef de file de l'hormonothérapie et a représenté le standard des traitements adjuvants et de la première ligne métastatique des cancers du sein RH positifs. C'est un composé non stéroïdien, triphényléthylique, qui a un mécanisme d'action complexe et des effets contradictoires selon les tissus : antagoniste au niveau de la glande mammaire et des cellules tumorales, il peut également se comporter comme un agoniste, parfois utilement (notamment sur l'os protégeant ainsi partiellement la déperdition osseuse), mais ailleurs de manière néfaste puisqu'il est potentiellement responsable d'accidents thrombo-emboliques et d'hypertrophies endométriales augmentant ainsi le risque d'adénocarcinomes de l'utérus. Le tamoxifène peut être prescrit à tous les âges et quelque que soit le statut ménopausique.

→ Autres SERMs

Les effets agonistes du tamoxifène, responsables d'effets secondaires parfois néfastes et probablement impliqués dans les mécanismes de résistance, ont conduit à la recherche d'anti-œstrogènes plus puissants et plus spécifiques.

- Le torémifène

C'est un dérivé chloré du tamoxifène. Il possède également une activité agoniste partielle et présente le même risque de maladie thromboembolique et endométriale que le tamoxifène. Il est peu utilisé en clinique car il ne présente aucun avantage par rapport au tamoxifène [25].

- Le raloxifène (Evista ®)

Sa structure chimique est différente du tamoxifène. C'est un benzothiphène non stéroïdien cliniquement apparenté au tamoxifène. Il possède les mêmes propriétés anti-œstrogénique que ce dernier au niveau du sein mais a des effets minimes au niveau de l'utérus [26] Son action anti-tumorale est toutefois beaucoup plus faible que celle du tamoxifène. Il n'a aucune AMM dans le traitement des cancers du sein mais est indiqué dans le traitement et la prévention de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées.

3. Les anti-œstrogènes purs ou SERDs

D'autres anti-œstrogènes dépourvus d'activité œstrogénique ont été développés. Le plus connu et le seul qui soit utilisé en clinique, est l'ICI 182,780. A la différence du tamoxifène, l'ICI 182,780 (ou fulvestrant, Faslodex ®) présente une structure stéroïdienne : c'est un dérivé de la 19-nor-testostérone. Il possède un mécanisme d'action différent du tamoxifène puisqu'il est dépourvu d'activité agoniste partielle : c'est un anti-œstrogène pur. Le fulvestrant est un inhibiteur compétitif de la liaison des œstrogènes à leur récepteur. En se fixant, il entraîne la destruction du récepteur *via* le protéasome [27]. Il se lie avec une affinité similaire à celle de l'œstradiol et supérieure à celle du tamoxifène. L'effet du fulvestrant est dépendant de la dose et une diminution de RP est également observée [28]

4. Les anti-aromatases (AAs)

Chez les femmes ménopausées, la seule source d'œstrogènes est la conversion périphérique des androgènes par l'aromatase car la production ovarienne massive des œstrogènes est alors abolie. Ces androgènes sont synthétisés au niveau de la glande surrénale et se retrouveront ensuite au niveau de tissus périphériques dont le tissu adipeux. En inhibant cette enzyme par des anti-aromatases, la production résiduelle des œstrogènes est donc inhibée chez la femme ménopausée.

Pour des raisons de toxicité mais surtout de spécificité et d'efficacité, seule la troisième génération d'AAs est actuellement utilisée. Elle comprend des inhibiteurs non stéroïdiens (l'anastrozole=Arimidex® et le létrozole=Fémara®) et un inhibiteur stéroïdien (l'exémestane=Aromazine®). Tous diminuent les taux d'œstrogènes circulants et intra tumoraux. Un avantage important est qu'ils sont dépourvus d'effet néfaste sur l'endomètre. Toutefois, en raison de la suppression quasi complète en œstrogènes, les AAs accélèrent le processus physiologique de déminéralisation osseuse, entraînant une augmentation du risque de fractures.

e. Autres thérapies ciblées

Les thérapies dites ciblées se sont particulièrement développées au cours de ces 15 dernières années. Elles sont le plus souvent associées à la chimiothérapie afin de retarder l'apparition de récurrences ou de métastases. Pour les cancers du sein, le meilleur exemple est le trastuzumab (Herceptin®). Il s'agit d'un anticorps monoclonal murin humanisé dirigé contre le domaine extra cellulaire de la protéine erbB2. La prescription de cette molécule aux patientes qui ont une tumeur métastatique surexprimant la protéine erbB2 et/ou avec amplification du gène correspondant, a transformé leur pronostic de survie. Cette molécule peut également être administrée en adjuvant. Un autre exemple de thérapie ciblée est le lapatinib (Tyverb®). Cette

molécule cible l'activité tyrosine kinase induite par la stimulation des récepteurs à l'EGF et d'erbB2. Une autre molécule a été récemment mise sur le marché : le bevacizumab (Avastin®). L'Avastin® est un anticorps monoclonal qui se lie à plusieurs formes du VEGF et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ces récepteurs. L'Avastin® et le Tyverb® ont une AMM en France pour une utilisation en métastatique. Enfin, d'autres thérapies ciblées sont actuellement évaluées dans des essais cliniques : anticorps monoclonaux ou inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase, de divers types de récepteurs membranaires (récepteur de l'IGFI par exemple), inhibiteurs de protéines intra cellulaires intervenant dans les voies de prolifération cellulaire et/ou de survie, inhibiteurs de la néo-angiogenèse. Parmi les inhibiteurs de protéines intracellulaires, le tipifarnib (qui est un inhibiteur de farnésylation qui sera décrit dans le chapitre III.8 de cette introduction) a fait l'objet d'essais cliniques de phase I et II et notamment d'une publication au sein du laboratoire [29].

II. Voies de signalisation œstrogénique et cancérogénèse mammaire

1. Les œstrogènes endogènes

Les œstrogènes dont le chef de file est l'œstradiol, sont des hormones stéroïdiennes qui stimulent la prolifération et la différenciation de nombreux tissus et en particulier du système reproductif femelle (utérus, vagin, ovaires, seins), (Figure 2) [30].

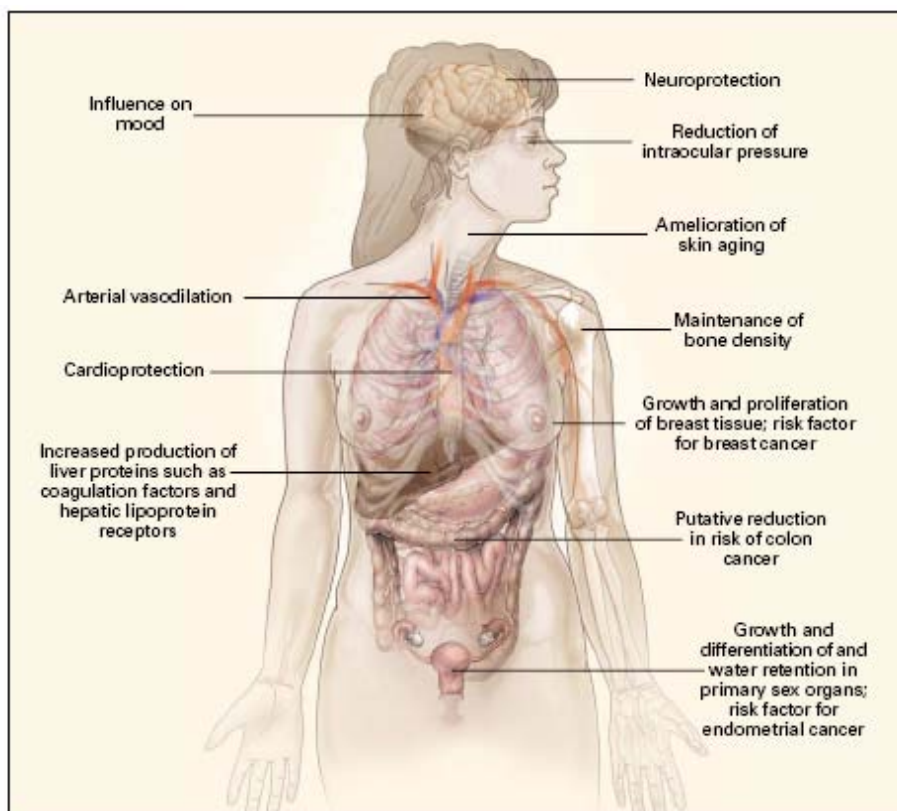


Figure 2 : Effets des œstrogènes sur l'organisme [30]

Les œstrogènes ciblent également de nombreux autres tissus dont l'os, le cartilage, le système nerveux central et le système immunitaire. L'œstrogène biologiquement le plus actif au niveau de la glande mammaire est le 17β œstradiol (E_2).

Les œstrogènes sont des dérivés du cholestérol tous synthétisés à partir de l'androsténone qui subit une aromatisation (Figure 3).

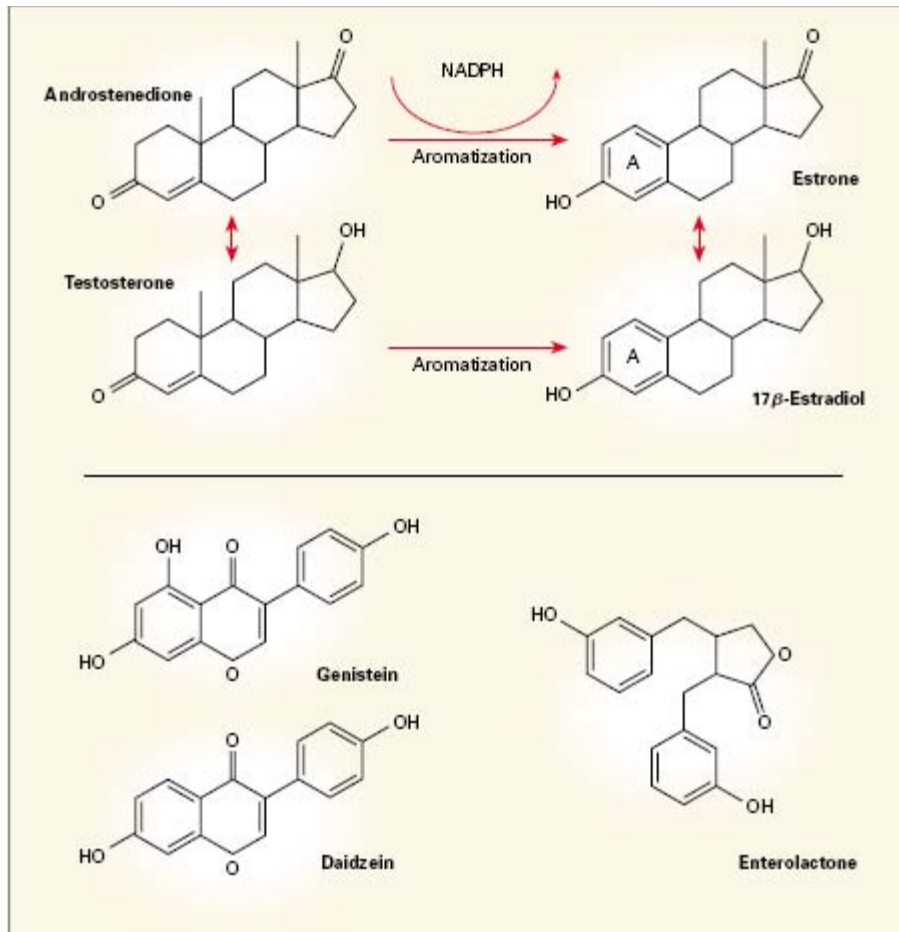


Figure 3 : Structure et production des œstrogènes endogènes et structure des phyto œstrogènes [30].

2. Les œstrogènes exogènes

Parmi ces œstrogènes exogènes, il y a les phytoœstrogènes et les xénoœstrogènes. Les phytoœstrogènes sont des composés non stéroïdiens présents dans plusieurs végétaux et qui

partagent des structures similaires avec les œstrogènes. Les phytoœstrogènes sont regroupés en 3 groupes : les isoflavones (fèves, soja, ...), les lignanes (aliments à grains entiers) et les coumestanes. Les lignanes comme les isoflavones se lient au RE. Or, comme nous le verrons plus loin, il existe également un deuxième RE : le RE β . Ces derniers ces composés ont une affinité plus grande pour le RE β alors que l'E₂ a une affinité similaire pour les deux récepteurs. Ces œstrogènes exogènes, à potentiel œstrogénique variable, mais relativement faible, peuvent se retrouver à des concentrations importantes dans l'alimentation ou certains environnements. Il a été remarqué que les populations des pays asiatiques, dont le régime est beaucoup plus riche en phytoœstrogènes que celles des pays occidentaux, ont une incidence du cancer du sein moindre. De ces observations, il a été suggéré que les phytoœstrogènes possèdent un rôle préventif dans l'apparition des cancers du sein [31]. Ces œstrogènes exogènes interfèrent avec le RE α mais également avec des enzymes du métabolisme cellulaire et des enzymes d'activation telles que les kinases. Les isoflavones et la génistéine modulent par exemple, l'activité enzymatique de l'aromatase CYP19 et de certains récepteurs à activité tyrosine kinase [31]. Plusieurs de ces œstrogènes exogènes peuvent, comme les œstrogènes endogènes, à des concentrations faibles, être à l'origine d'effets rapides par « une voie non génomique » que nous décrirons plus loin. De plus, il a été proposé que ces phytoœstrogènes puissent être bénéfiques chez la femme ménopausée, en particulier chez celles atteintes de bouffées de chaleur. Toutefois, des controverses sur la réponse des patientes existent encore à ce jour [32].

3. Structure et localisation des récepteurs des œstrogènes

Les RE appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN) comprenant entre autres les récepteurs des autres hormones stéroïdes (androgènes, progestérone, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes) et des vitamines liposolubles [33]. Ces RN sont stabilisés sous forme activable dans le cytoplasme, grâce à des protéines chaperonnes.

Trois classes de RN existent :

- **la classe I** regroupe les récepteurs stéroïdiens activés par la liaison des molécules hormonales stéroïdiennes. Ils s'homodimérisent et lient un élément de réponse organisé en 2 séquences inversement répétées (HRE pour Hormone Responsive Element).

- **la classe II** regroupe des RN dont l'activation est indépendante du ligand. Ils peuvent s'homo- ou s'hétérodimériser. Ils lient des éléments de réponse organisés en 2 séquences directement répétées.

- **la classe des récepteurs orphelins** dont les ligands n'ont été qu'en partie caractérisés.

Les RE appartiennent à la classe I des RN. Ils interagissent avec les œstrogènes, les SERMs et les SERDs.

a. Le récepteur des œstrogènes α

L'ADN complémentaire du RE humain a été cloné en 1986 [34] et la séquence complète de l'ARNm extrait d'une lignée de cellules d'adénocarcinome mammaire humain (cellules MCF-7), a également été déterminée par cette équipe [34]. Le gène du RE α (ou gène *ESR1*) est localisé sur le bras long du chromosome 6, précisément sur le locus 6q25. Il est composé de 8 exons, séparés par 7 longues régions introniques. Il code pour une protéine de 65 kDa, contenant 595 acides aminés et présente 5 domaines indépendants mais interactifs au niveau fonctionnel [35]. Ces 5 domaines sont communs à la structure de tous les RN (Figure 4).

- ***Le domaine NH2 terminal ou domaine A/B***

Le domaine N-terminal, domaine A/B est hautement variable entre les différents récepteurs. Sa taille varie entre 24 et 603 acides aminés (respectivement pour le récepteur de la vitamine D3 et celui des minéralocorticoïdes) et est de 180 acides aminés pour le RE α . Il contient le domaine d'activation autonome d'activation de la transcription dépendante de la liaison de l'hormone au RE (AF-1).

- ***Le domaine central ou domaine C***

C'est le domaine le plus conservé des RN. Sa taille est de 83 acides aminés pour le RE α . Sa structure organisée autour de deux régions en doigt de zinc, riches en cystéine, lui confère une forte capacité de liaison à l'ADN. Il contient donc le domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain= DBD). Le DBD se lie à des Elements de Réponse aux œstrogènes (ERE : Estrogen Responsive Elements) au niveau de l'ADN afin de moduler la transcription de gènes cibles.

- ***Le domaine D***

C'est le domaine le moins conservé entre les différents récepteurs. Il joue le rôle de charnière entre les domaines C et E. Il contient également des séquences de localisation nucléaire (NLS).

- *Le domaine E*

C'est le domaine le mieux conservé entre les différents récepteurs nucléaires. Il contient le domaine de liaison du ligand (Ligand Binding Domain= LBD) et la fonction d'activation de la transcription inductible par l'hormone (AF-2). Le ligand peut être l'œstrone (E_1), l'œstradiol (E_2) ou un SERM ou SERD. Cette région est également impliquée dans la localisation nucléaire du RE, dans les phénomènes de dimérisation du récepteur et dans l'interaction avec les cofacteurs transcriptionnels.

- *Le domaine C terminal ou domaine F*

Le domaine F est peu conservé parmi les récepteurs nucléaires au niveau de sa séquence, mais bien conservé au niveau de sa taille. Il pourrait être impliqué dans les mécanismes d'action des anti-œstrogènes.

Les domaines AF-1 et AF-2 sont nécessaires à l'activation de la transcription du récepteur RE α mais sont dépourvus des motifs conventionnels des facteurs de transcription. Par conséquent, ils agissent en recrutant d'autres facteurs tels que les coactivateurs (CoA).

AF-1 et AF-2 peuvent agir en synergie pour activer la transcription de gènes cibles dans de nombreux modèles cellulaires. Toutefois, dans certains contextes cellulaires et/ou selon les promoteurs, ils peuvent l'un ou l'autre, moduler la transcription de gènes de manière indépendante [36]. Il a aussi été suggéré que l'activité AF-1 du RE β pourrait être négligeable par rapport à l'activité du RE α alors que l'activité AF-2 des deux isoformes est identique [37].

b. Le récepteur des œstrogènes β

Le gène codant l'isoforme β du RE a été cloné chez l'homme en 1996. Le gène du RE β est localisé sur le chromosome 14 et code pour une protéine de 530 acides aminés, d'environ 60

kDa. Il présente une forte homologie avec le RE α , particulièrement au niveau du domaine de liaison à l'ADN (96%) et dans le domaine de liaison au ligand (58%). En raison de leur forte homologie au niveau du DBD, les deux isoformes du RE se lient aux ERE avec une affinité similaire.

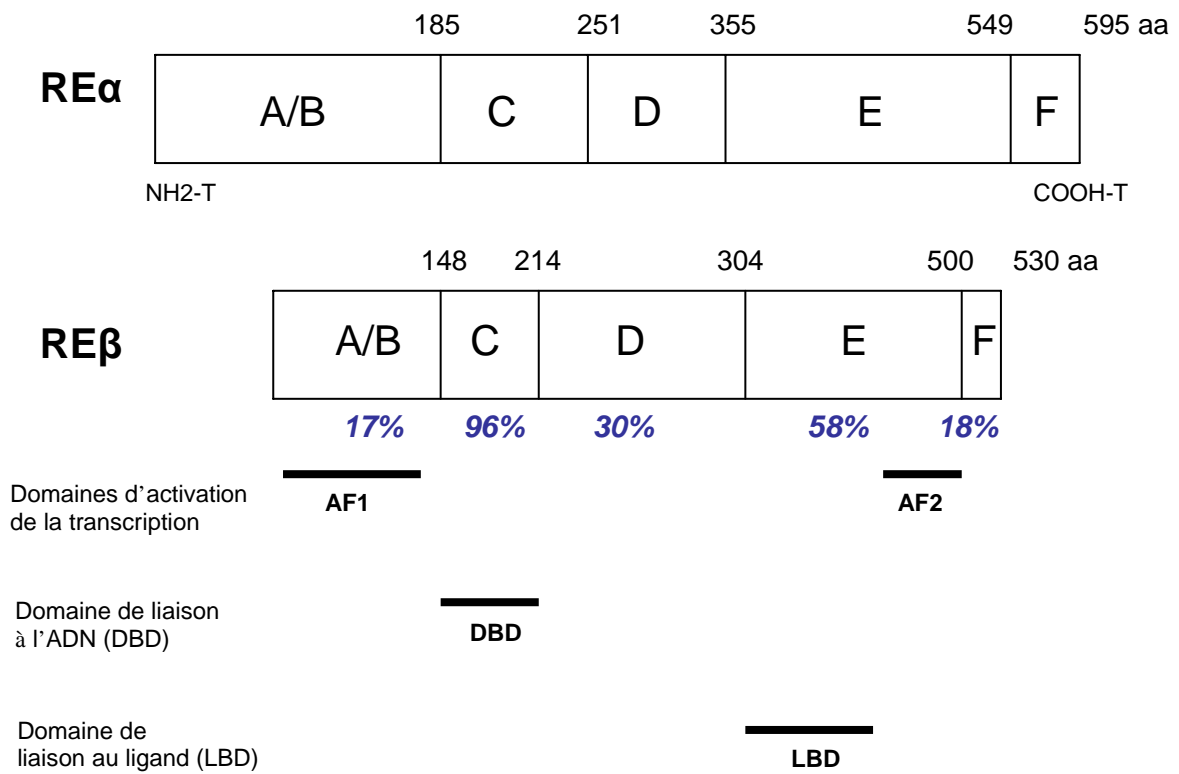


Figure 4 : Représentation schématique de la structure des domaines fonctionnels des RE α et RE β
 % : pourcentage d'homologie entre les domaines fonctionnels du RE α et du RE β

Au niveau de la glande mammaire, le RE β est la forme majoritaire alors que le RE α constitue la forme majoritairement observée dans les cancers du sein. En effet, des travaux ont montré que l'expression du RE β est plus faible dans le tissu tumoral que dans le tissu mammaire sain, alors qu'à l'inverse, l'expression du RE α est plus élevée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain [38].

Des travaux de Zhao ont suggéré que le promoteur du RE β pouvait être hyperméthylé dans des lignées de cancers du sein par rapport à des lignées non cancéreuses [39]. Ceci pourrait expliquer les taux faibles d'ARNm du RE β observés dans les lignées cancéreuses.

Dans les études utilisant des lignées de cancers du sein, il est admis que la prolifération est due au RE α . De plus, la plupart des lignées dépendantes des œstrogènes (MCF-7, T47D, ...) expriment fortement le RE α mais faiblement l'isoforme β . Le RE β aurait donc un effet anti-prolifératif. Ceci a été suggéré par Hartman et son équipe [40]. Ils ont montré que lorsque le RE β est exprimé à nouveau dans des lignées RE α positives, ces dernières prolifèrent moins vite. Le RE β apparaît s'opposer à l'action du RE α : dans certaines situations cliniques, il y aurait un rétrocontrôle négatif du RE β dans l'épithélium des cancers du sein par rapport au tissu normal. Ceci renforce l'hypothèse d'un rôle du RE β dans la cancérogenèse mammaire. Il a été également mis en évidence une corrélation inverse entre le RE β et le marqueur de prolifération KI67 [41].

En pratique clinique, seule l'expression du RE α est systématiquement recherchée. En effet, elle a une valeur pronostique et prédictive de réponse à l'hormonothérapie qui est parfaitement validée. A l'inverse, la signification pronostique et prédictive de réponse à l'hormonothérapie du RE β fait encore l'objet de nombreuses études et est sujette à controverses.

Les RE α et β , possèdent des variants d'épissage. En effet, un épissage alternatif du pré-ARN du RE α augmente la diversité des produits de ce gène permettant ainsi la régulation de la protéine

native. La plupart des variants d'épissage du RE α proviennent d'un saut d'exon alors que pour le RE β ceux-ci proviennent d'une différence dans la séquence des exons [42].

Le variant le plus connu pour le RE α est le RE α 46 qui code pour une protéine de 46kDa. Il est capable d'inhiber le RE α (*via* AF-1) et peut former des dimères avec le RE α ou β [43].

Pour le RE β , le variant le plus connu est le variant RE β 2 aussi appelé RE β cx. Ce variant possède une région AF-2 tronquée et ne possède pas d'affinité détectable pour l'E $_2$. L'équipe de Zhao a montré que cette isoforme pouvait induire la dégradation du RE α *via* le protéasome, en formant des hétérodimères RE α /RE β cx [44].

4. Les voies de signalisation œstrogéniques

a. Les différentes voies de signalisation

A l'heure actuelle, il est possible de différencier 4 grandes voies de signalisation œstrogéniques faisant intervenir divers éléments :

- la voie génomique dépendante du ligand (voie classique)
- la voie génomique indépendante du ligand (interrelations avec les facteurs de croissance)
- la voie génomique indépendante de l'ERE
- la voie non génomique (effets rapides des œstrogènes).

Ces voies ont été particulièrement étudiées pour le RE α mais celles du RE β sont moins connues bien que comparables malgré des effets souvent opposés.

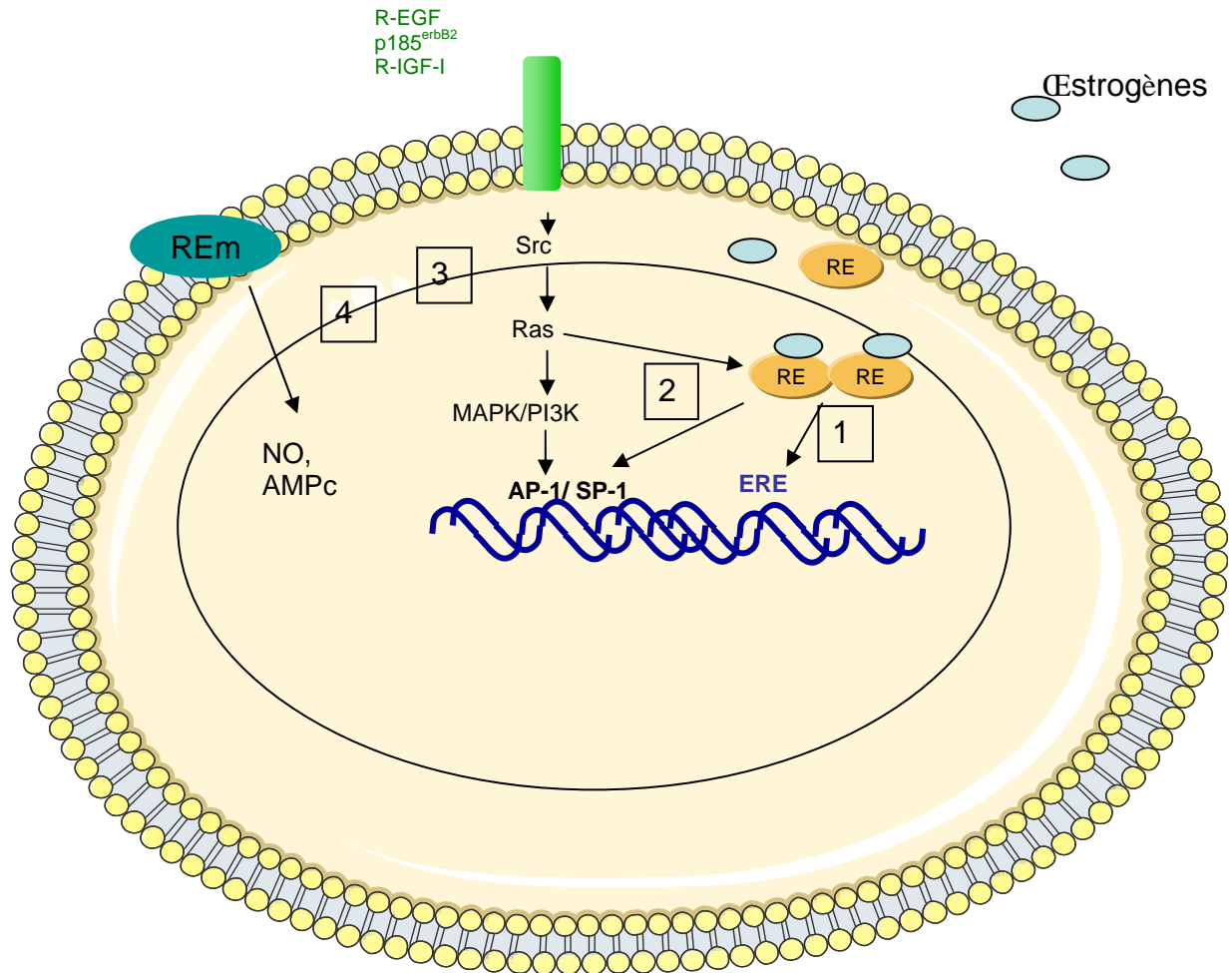


Figure 5 : Les différentes voies de signalisation œstrogénique

1. Voie génomique dépendante du ligand= voie classique
2. Voie génomique indépendante de l'ERE
3. Voie génomique indépendante du ligand= voies de dialogues avec les facteurs de croissance
4. Voie non génomique rapide

La voie génomique dépendante du ligand ou voie classique

La liaison de l'E₂ sur le RE α se fait sur son domaine LBD et à proximité du domaine d'activation AF-2 (Figure 5). Cette liaison provoque la dissociation du RE α du complexe (apo-récepteur) de protéines chaperones (Hsp 90, immunophilines, ...) auxquelles il est associé en absence de l'hormone. Elle entraîne des modifications conformationnelles du RE α , sa dimérisation ainsi que sa phosphorylation au niveau du domaine AF-1 (en particulier sur les sérines 104, 106, 118 et 167). Le complexe ligand/récepteur ainsi formé interagit sous forme dimérique avec des séquences ERE consensus ou non (*via* le DBD du récepteur), contenues dans le promoteur des gènes cibles. Il existe en effet, des séquences ERE dites consensus, constituées de deux demi-palindromes inversés de 5 bases séparés par 3 bases aléatoires (GGTCAnnnTGACC), et des séquences ERE non consensus de longueurs variables. Le RE α peut aussi lier des sites AP-1 ou sp1 dans certains cas. Le RE α lié à l'ADN régule alors la transcription de ses gènes cibles grâce à l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle et à la dynamique de cofacteurs : recrutement de co-activateurs (CoA) et départ dans certains cas de co-répresseurs (CoR) au niveau des domaines d'activation transcriptionnelle, AF-1 et AF-2 du RE α .

Les cofacteurs de transcription appartiennent à des structures complexes composées d'éléments protéiques et nucléiques associés au RE α . Ils possèdent des activités enzymatiques qui entraînent des modifications épigénétiques de la chromatine et ainsi une modulation de la transcription (activation ou inhibition). Les CoA du RE α possèdent des activités histone acétyltransférase (HAT) ou histone méthyltransférase (HMT). A l'inverse, les CoR possèdent des activités histone déacétylase (HDAC) ou HMT. Les protéines à activité HAT provoquent une acétylation des histones et ainsi une perte des charges positives des lysines amenant la chromatine à un état plus relâché. Le déroulement de l'ADN permet alors un accès plus facile aux facteurs transcriptionnels et aux ARN polymérases et donc une activation de la

transcription. Les HDAC, en rétablissant la charge positive des lysines, entraînent une répression transcriptionnelle. A l'inverse, le rôle des HMT varie selon le site et le degré de méthylation. Les HMT, HAT et HDAC modifient les histones mais sont aussi capables d'agir sur des facteurs de transcription tels que p53, des récepteurs nucléaires (le RE α lui-même) ainsi que des protéines chaperonnes ou des protéines du cytosquelette.

Nous reviendrons dans le dernier paragraphe de cette introduction sur l'importance thérapeutique de l'inhibition de ces phénomènes d'acétylation.

La voie génomique indépendante du ligand (inter-relations avec les facteurs de croissance)

D'autres voies de signalisation peuvent moduler l'activité du RE α , en particulier *via* sa phosphorylation ou celle de ses co-facteurs. Ces voies peuvent faire intervenir des protéines kinases (PKA, PKC), des régulateurs du cycle cellulaire ainsi que des signaux extracellulaires. Des facteurs de croissance, comme l'EGF ou l'IGF, permettent l'activation du RE α ou de ses gènes cibles en absence d'E₂. Les cibles des kinases sur le RE α sont situées principalement au niveau du domaine AF-1[45].

Les mécanismes d'interaction entre ces deux voies ne sont pas encore clairement élucidés. Toutefois, une activation du RE α par phosphorylation, indépendamment de l'E₂ sur certains résidus peut constituer une explication. En effet, il a été montré que la sérine 118, située dans le domaine AF-1 du RE, peut être phosphorylée par la voie des MAPK à la suite d'un traitement avec l'EGF ou l'IGF. A l'inverse, l'E₂ peut induire la phosphorylation des récepteurs de l'EGF et de l'IGF dans des cellules MCF-7 [46] aboutissant ainsi à l'activation de la voie des MAP kinases. Ceci a notamment été confirmé en inhibant ou bloquant ces récepteurs.

La voie génomique indépendante de l'ERE

- Sites de fixation directs du RE α sur ses gènes cibles, autres que des ERE

A coté de l'interaction directe du RE α avec un ERE, le RE α peut activer la transcription de gènes dont les promoteurs ne possèdent pas d'ERE. En effet, il apparaît qu'environ 1/3 des gènes dont la transcription est modulée par les RE ne contiennent pas de séquences consensus ERE dans leur région promotrice [47, 48]. L'équipe de Carroll a effectué une cartographie de tous les sites de liaison dans le génome, du RE α et de l'ARN polymérase II dans des MCF-7, modèles de cellules de cancers mammaires hormono-dépendantes. Il a été identifié 3665 sites de liaison pour le RE α (tout les 839 kb) et 3629 pour l'ARN polymérase II (tout les 847 kb). Seulement 4% des sites du RE α alpha se retrouvent au niveau de régions proximales de promoteurs de gènes connus. Les auteurs ont également identifié des sites de liaison en *cis* dans des MCF-7.

- Liaison indirecte *via* d'autres facteurs transcriptionnels

Le RE α peut se lier indirectement à l'ADN *via* des facteurs de transcription tels que Sp1, AP-1 ou NF- κ B et ainsi réguler la transcription des gènes par une voie indépendante des ERE. Nous allons développer succinctement chacune de ces liaisons.

La famille des facteurs de transcription Sp1 (Specificity protein 1) joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation et l'angiogenèse [49]. Le facteur de transcription Sp1 peut se lier à des régions riches en GC présentes sur les promoteurs des gènes régulés par les œstrogènes. C'est le cas des gènes *c-myc* et du récepteur de la progestérone.

Le facteur de transcription AP-1 est un complexe contenant fos/jun et d'autres protéines. Plusieurs gènes régulés par l'E $_2$, comme *IGF-1* ou *pS2*, ont une transcription dépendante d'AP-1.

Le RE α peut également inhiber la liaison à l'ADN des facteurs de transcription, tels que NF- κ B de manière dépendante de E₂ mais le mécanisme est peu connu [50]. Le RE α peut à l'inverse agir en synergie avec NF- κ B pour induire la transcription de gènes cibles [51].

Les facteurs de transcription STAT résident initialement dans le noyau et sont activés par phosphorylation sur un résidu tyrosine dans la partie C terminale de la protéine. La stimulation dans le cytoplasme de la phosphorylation de STAT5 par le RE α et les facteurs de croissance résulte en l'activation de STAT5 et sa translocation dans le noyau. Ainsi, il peut stimuler la transcription de certains gènes [52].

La voie d'activation génomique indépendante de l'ERE constitue donc un point de convergence supplémentaire entre les voies activées par le RE α et les voies stimulées par des récepteurs des facteurs de croissance (MAPK et PI3K/AKT).

La voie non génomique

L'observation d'effets biologiques rapides induits par l'E₂ au niveau de plusieurs tissus suggère que les œstrogènes peuvent également provoquer des effets non génomiques. Ces effets passeraient par l'intermédiaire d'une sous-population de récepteurs présente au niveau des membranes cellulaires.

- Des RE membranaires pour expliquer les effets non génomiques des RE

Les travaux du groupe d'Aurichio ont été les premiers à démontrer et à faire accepter qu'une faible proportion de RE α (<5%), variable selon le type cellulaire, pourrait être cytoplasmique et/ou membranaire [53].

D'après l'équipe de Zhang, le RE membranaire forme des complexes ternaires avec les récepteurs à activité tyrosine kinase et des protéines adaptatrices comme Shc et p85 pour

activer secondairement la voie de prolifération cellulaire (MAPK) et/ou de survie (PI3K/AKT) [54].

L'équipe de Razandi a montré que le RE α endogène interagit avec les cavéolines 1 et 2 dans des cellules MCF-7 et dans des cellules musculaires lisses [55]. La surexpression de la cavéoline 1 dans les MCF-7 augmente de façon dépendante de l'E₂ la translocation du RE à la membrane.

MNAR (Modulator of Non genomic Action of Estrogen Receptor, Modulateur de l'Activité Non génomique du RE α) est une protéine adaptatrice qui peut se lier aux PI3K *via* la phosphorylation d'une tyrosine, au RE α *via* une séquence LXXLL semblable aux coactivateurs et enfin à c-Src grâce à un motif riche en proline. Ces données montrent que MNAR interagit avec le RE α et Src pour conduire à l'activation de Src [56].

- Des récepteurs à 7 segments transmembranaires couplés à une protéine G (RCPG)

L'équipe de Carmeci a identifié le GPR30, dont l'acronyme officiel est aujourd'hui GPER, qui est un récepteur membranaire homologue aux récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), capable de transmettre un signal par l'E₂ [57].

Comme tout RCPG, GPR30 est couplée aux protéines G trimériques (sous unités α , β et γ). Après activation des protéines G, E₂ peut induire l'activation de Src et le clivage *via* des métalloprotéases du pro HB-EGF (Heparan Bound- Epidermal Growth Factor). Les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ agiraient comme une passerelle entre Src et les métalloprotéases. Le relargage de HB-EGF permet l'activation du récepteur de l'EGF et ainsi l'induction des MAPK [58].

Le GPR30 peut également permettre l'augmentation de la production d'AMPc dans des cellules tumorales mammaires *via* l'activation de l'adénylate cyclase. Ce phénomène se produit lorsque la sous-unité αs des protéines G est recrutée [59].

Le GPR30 est largement exprimé dans des lignées tumorales mammaires telles que les MCF-7 (RE positives) et les SK-BR-3 (RE négatives) mais également dans d'autres lignées telles que

les cellules Hec1A et Hec50 (cellules de cancer de l'endomètre) et BG-1 (cellules tumorales ovariennes). Dans la plupart de ces lignées, le GPR30 peut stimuler la prolifération [60 , 61], suggérant un effet de ce récepteur dans l'oncogénèse.

Les anti-œstrogènes partiels inhibent la prolifération. Or l'anti-œstrogène partiel qu'est le tamoxifène peut se lier au GPR30 : il a alors une activité agoniste et peut ainsi stimuler la prolifération cellulaire. Ce phénomène pourrait en partie expliquer les phénomènes de résistance à l'hormonothérapie.

La résistance au tamoxifène dans des cellules MCF-7 est à l'origine d'une relocalisation du RE α vers le noyau [62]. En effet, des cellules Tam^{R1} (MCF-7 rendues résistantes au tamoxifène par pression de sélection) montre un taux élevé d'AKT phosphorylé et de RE α phosphorylé sur le résidu 167. D'autres études in vitro, montrent que l'amplification d'ERBB2 ou la surexpression de l'EGFR altère la localisation du RE α , qui se retrouve alors en grande concentration dans le cytoplasme [63].

b. Les cofacteurs du RE α

Les cofacteurs de transcription appartiennent à des structures complexes composées d'éléments protéiques et nucléiques associés au RE α . Ils possèdent des activités enzymatiques qui entraînent, entre autres, le remodelage de la chromatine par acétylation/déacétylation des histones, par méthylation/déméthylation. En général, la liaison d'un ligand agoniste au niveau du RE α entraîne un échange de corépresseurs en faveur de coactivateurs pour faciliter la transcription de gènes cibles, selon un équilibre cyclique et dynamique parfaitement décrit par Métivier dans des cellules MCF-7 pour le gène *pS2* [64].

Les Coactivateurs (CoA)

Par définition, les CoA interagissent directement avec les RN et ont un rôle dans l'activation de la transcription.

Il existe deux familles de CoA :

- ceux qui façonnent le nucléosome de façon dépendante de l'ATP. Les complexes SWI/SNF par exemple participent à la réorganisation spatiale des nucléosomes de manière dépendante de l'ATP, facilitant ainsi l'accès de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN.
- ceux qui possèdent une activité enzymatique intrinsèque histone acétyltransférase (HAT) ou méthyltransférase (HMT).

Pour être activés, les CoA doivent être phosphorylés par des kinases spécifiques dont l'activité est stimulée par les hormones stéroïdes, mais aussi les facteurs de croissance, l'AMP cyclique, le TNF β et les kinases intracellulaires.

Les CoA se regroupent en 12 familles : la famille P160, le complexe CBP/p300/pCAF, la famille RIP (Receptor Interacting Protein), TIF1 α , ARA₇₀, NCoA-62, TIP 160, PBP (PPAR Binding Protein), P68, E6-AP (E6 Associated Protein), L7/SPA et SRA.

La famille P160 regroupe SRC-1 (NcoA1), SRC62 (TIF2/GRIP-1/NcoA2) et SRC-3 (AIB1/RAC3/ACTR). Cette famille est composée de 3 membres qui possèdent des domaines structuraux communs. Le domaine central de ces protéines est responsable de l'interaction avec le RE au niveau du domaine AF-2 (situé dans le LBD). Les deux domaines au niveau C terminal sont impliqués dans l'activation de la transcription et permettent également les interactions avec le complexe CBP/p300 ou avec une protéine à activité méthyltransférase [65].

Un motif NID (Nuclear Interaction Domain) est présent sur les RN pour interagir avec les protéines SRC. Il est formé de séquences de 5 acides aminés : LXXLL (où L est la leucine et X un acide aminé indifférent).

Le rôle prépondérant de SRC-1, puis de SRC-3 (AIB1), a été clairement mis en évidence dans la sensibilité aux anti-œstrogènes des tissus mammaires. En effet, des données *in vitro*, montrent que la surexpression de SRC-1 ou AIB1 peut augmenter la transcription de gènes contenant dans leur promoteur une séquence ERE sous l'effet de l'E₂ et favoriser l'effet agoniste du métabolite actif du tamoxifène, le 4-hydroxy-tamoxifène [66]. Une autre étude montre que la surexpression d'AIB1 associé à celle d'ERBB2 est un facteur de résistance au traitement par le tamoxifène [67].

Les co-répresseurs (CoR)

Les CoR ont une activité inverse des CoA : ils recrutent des complexes qui ont une activité histone déacétylase (HDAC) ou histone méthyltransférase (HMT). Ils maintiennent la chromatine dans un état condensé qui ne permet pas l'activation de la transcription. Ils interagissent avec le RE α . Ils interagissent avec le RE α en l'absence de ligand ou en présence d'antagonistes [68].

Ils sont en nombre plus restreint que les CoA. Parmi eux deux familles sont bien étudiées : NcoR (Nuclear Receptor Corepressor), SMRT (Silencing Mediator of Retinoïd and Thyroïd receptor).

Les HDAC, en rétablissant la charge positive des lysines, entraînent une répression transcriptionnelle. En absence de ligand ou en présence d'AE, le RE α est associé à des CoR tels que N-CoR ou SMRT. L'activité HDAC de ces CoR est nécessaire pour la répression de la transcription. La stimulation œstrogénique rapide (1h) de modèles cellulaires mammaires entraîne l'inhibition transcriptionnelle de 52% des gènes du génome [48]. Les œstrogènes

peuvent induire en effet le recrutement de NRIP1 qui ensuite se fixe sur l'ADN *via* des complexes RE-AP-1 pour induire la répression de la transcription des gènes régulés par des œstrogènes.

5. Modifications post-traductionnelles et devenir du RE α

Les modifications post-traductionnelles des protéines sont connues comme étant importantes dans la régulation de la stabilité et de l'activité de ces protéines. Le RE α subit lui-même plusieurs de ces modifications, avec les phénomènes de phosphorylation dont nous avons déjà parlés, mais aussi d'acétylation, de SUMOylation et de palmitoylation.

a. Phosphorylation du RE α

Il peut donc être phosphorylé sur de nombreux sites (Figure 6 en bas du paragraphe) :

La phosphorylation du RE α régule la localisation, la liaison à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle du RE α . La phosphorylation de la sérine 118 est effectuée par des kinases de la voie des MAP kinases (ERK1/2) ou GSK3 β alors que pour la sérine 167, ce sont les PI3K mais également les MAPK [69]. De façon générale, la phosphorylation sur des résidus sérines situés dans le domaine AF-1 influence le recrutement de coactivateurs ce qui aboutira à une augmentation de la transcription activée par le RE α . Ce phénomène a notamment été montré par l'équipe de Le Goff [70] : en remplaçant les résidus sérine 104, 106 et 118 du RE α par un résidu alanine, le RE α a une capacité d'activer la transcription moindre que le RE sauvage. Toutefois, le site de phosphorylation le plus étudié est la phosphorylation de la sérine 118 au niveau du domaine AF-1 du RE α . Les œstrogènes ainsi que les facteurs de croissance comme l'EGF et l'IGF peuvent phosphoryler le RE α [71]. De plus, les sérines 118 et 167 sont les sites majeurs de phosphorylation résultant de l'activation de la voie ras-raf-MAPK *in vivo* [72]. La phosphorylation du RE α sur la sérine 118 a été décrite comme un potentiel marqueur de

réponse au tamoxifène. En effet, l'équipe de Murphy [71] a montré sur une cohorte de patientes que la phosphorylation sur ce résidu est un marqueur de la fonctionnalité de la voie dépendante du ligand et propose la phosphorylation sur la sérine 118 comme marqueur de réponse au tamoxifène plutôt que l'expression du RE α .

Une autre étude a montré le rôle de la phosphorylation sur la sérine 167 du RE α sur la réponse à l'hormonothérapie [73]. En effet, une corrélation positive a été observée entre la phosphorylation de la sérine 167 et la survie des patientes atteintes de cancer du sein et traitées par hormonothérapie.

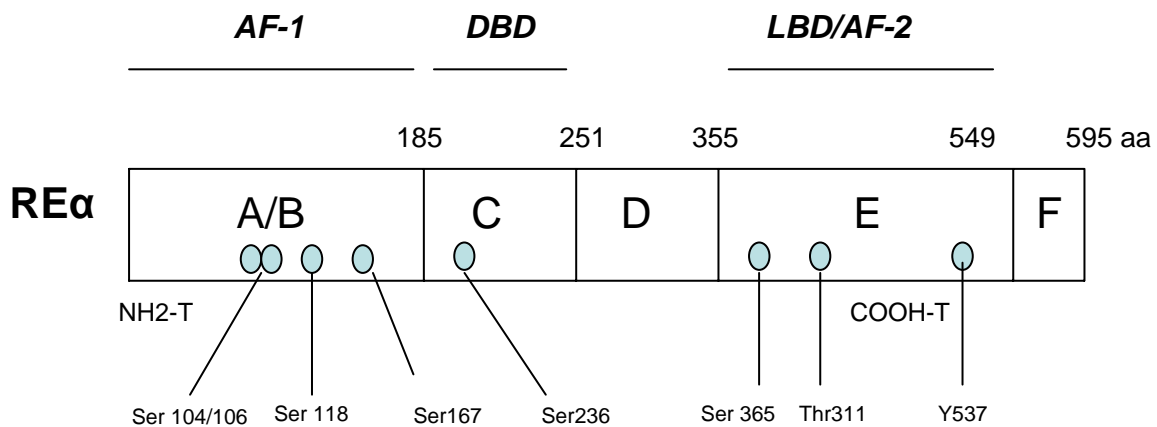


Figure 6 : Sites de phosphorylation du RE α

b. Acétylation du RE α

Il a été montré que le RE α peut être acétylé sur des résidus lysines (lys 266 et 268) par l'acétylase p300 [74]. Cette modification joue également un rôle dans la modulation de la transcription par le RE α et dans la phosphorylation du RE α . En effet, la phosphorylation du RE α sur la sérine 305 bloque l'acétylation de ce même récepteur sur la lysine 303 [75].

c. SUMOylation du RE α

Plus récemment, une nouvelle modification post-traductionnelle a été décrite : la SUMOylation (appelé également modification SUMO Small Ubiquitin like Modifier) [76]. Cette modification consiste en l'attachement de motifs SUMO (98 acides aminés) sur des résidus lysines du RE α . Le mécanisme de la sUMOylation est transposable à celui de l'ubiquitination mais n'entraîne pas la dégradation du récepteur. Il permet comme les autres modifications post-traductionnelles de moduler la transcription dépendante du RE α .

d. Ubiquitination du RE α

Le RE α est dégradé par le système d'ubiquitines par protéolyse. Il peut être dégradé indépendamment de la fixation du ligand ou après fixation de celui-ci [76]. La dégradation indépendante de la fixation du ligand fait intervenir une E3 ligase alors que la dégradation ligand dépendante fait intervenir différentes E3 ligases.

La régulation du RE α peut se faire à différents niveaux. L'E₂ régule directement la protéine RE α en « marquant » la protéine pour la dégradation *via* le protéasome [77]. Il a également été décrit que la phosphorylation du récepteur sur la sérine 118 induite par les œstrogènes peut protéger le récepteur de la protéolyse. Ce phénomène concernerait toutefois une faible proportion des RE α [78]. Les œstrogènes peuvent également stabiliser l'ARNm de ce récepteur [79]. Ces auteurs ont aussi observé qu'un traitement par l'E₂ de cellules MCF-7 diminue le taux d'ARNm du RE α . En effet, en absence d'E₂ le temps de demi-vie de l'ARNm du RE α est de 4h alors qu'en sa présence, il est de 40 minutes. Cette régulation de la stabilité de l'ARNm est indépendante de la synthèse protéique et l'association aux ribosomes est requise.

III. Les GTPases de la famille Rho

1. Définition et structure des protéines Rho

a. Définition

Les GTPases de la famille Rho (Figure 7) appartiennent à la superfamille Ras. Cette superfamille est composée de 5 groupes : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf. Ce sont des protéines G monomériques, capables de lier le GTP, de faible poids moléculaire (20 à 40 kDa). Ces protéines jouent le rôle d'intermédiaire dans la transmission des signaux intracellulaires, contrôlant ainsi de nombreux processus biologiques [80]. Elles sont retrouvées dans de nombreuses espèces allant de la levure à l'homme. Le rôle de ces protéines est régulé par un cycle d'échange GTP/GDP. Chez les mammifères, 22 gènes codent au moins 25 protéines constituant la famille Rho. Une étude phylogénétique de l'équipe de Boureux a répertorié les protéines Rho en 8 sous-familles, réparties en 4 sous groupes [81] : le groupe I contient les familles Rho (A-C) Rnd (1-3) et RhoD/RhoF ; le groupe II, les familles Rac/RhoG, Cdc42/RhoJ/RhoQ et RhoU/RhoV ; le groupe III, la protéine RhoH et le groupe IV, les protéines RhoBTB1 et RhoBTB2. RhoBTB et RhoT/miro sont considérées comme des RhoGTPases atypiques puisqu'elles sont très différentes au niveau de la structure, de leur régulation et de leur fonction par rapport aux autres protéines Rho.

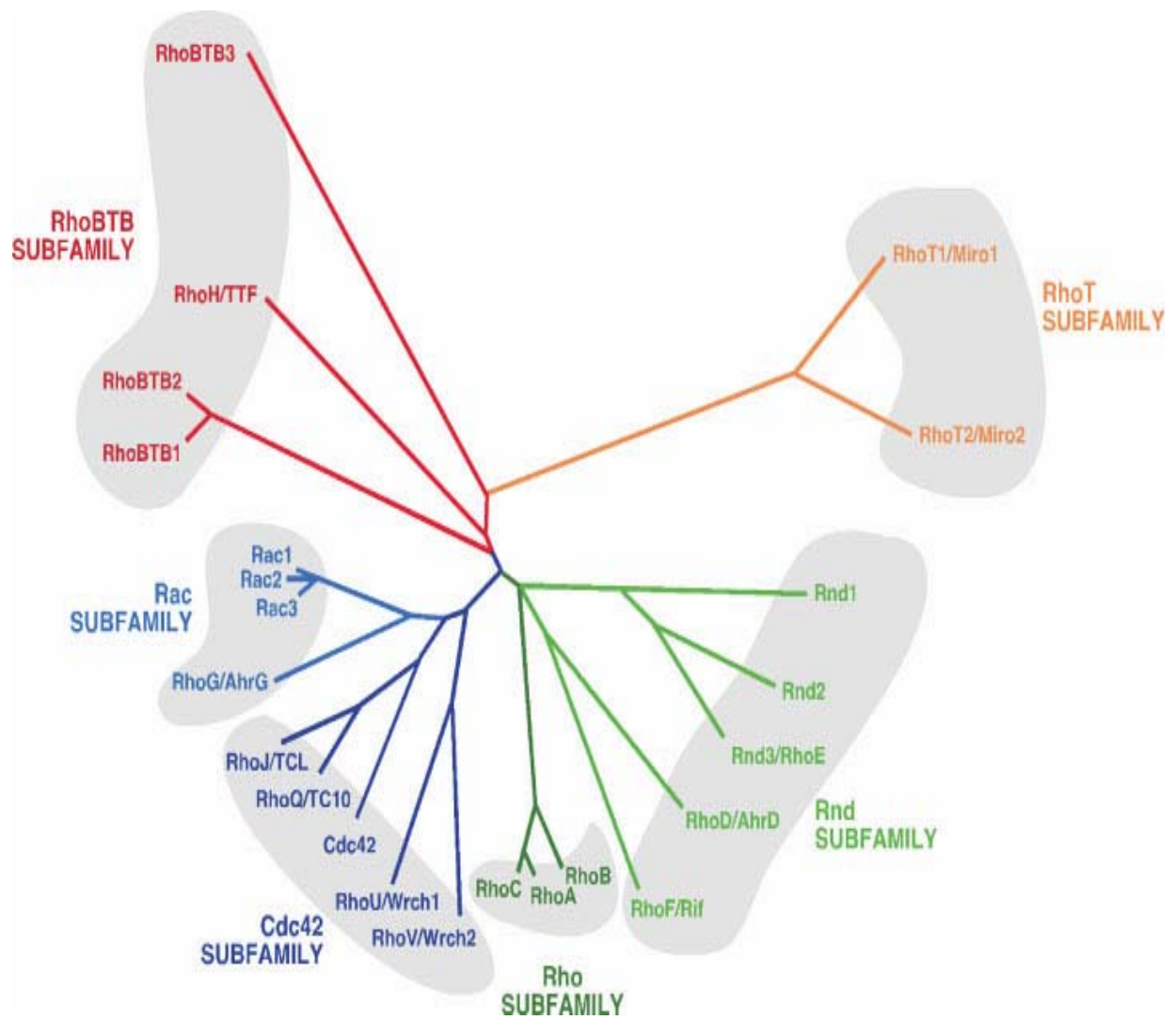


Figure 7 : Famille des GTPases Rho [81]

b. Structure des protéines Rho

A l'exception de RhoBTB1 et RhoBTB2, les protéines Rho sont des protéines de petite taille (190 à 250 acides aminés), constituées essentiellement d'un domaine GTPase et de courtes extensions N et C-terminales (Figure 8). Les protéines de la famille Rho partagent environ 30% d'homologie de séquences en acides aminés sur leur domaine GTPase avec les protéines Ras et 40 à 95% entre elles [82].

Elles partagent également un ensemble d'éléments contenant des motifs de liaison au GDP/GTP ainsi que deux domaines appelés switch 1 et switch 2. Ces deux domaines subissent un changement conformationnel important, selon la nature du nucléotide lié à la protéine permettant ainsi l'interaction avec les effecteurs [83]. La région C-terminale est une région dite « hypervariable » car la majorité des différences de séquences primaires entre les différentes protéines Rho se trouve dans cette région de 25 acides aminés. La structure tridimensionnelle des Rho GTPases s'organise en 6 feuillets β associés entre eux par des hélices α [84]. De plus, les GTPases de la famille Rho se distinguent des autres petites GTPases de la superfamille Ras par la présence d'une insertion d'environ 13 acides aminés disposés en hélice α , appelée « Rho Insert Domain » au sein de leur domaine GTPase [85]. Cette région joue un rôle important dans l'activation de certains effecteurs, bien qu'elle soit située au sein d'une région distincte des domaines switch [86].

2. Expression

L'expression de RhoA, Rac-1 et Cdc42 est relativement stable dans la majorité des tissus. Toutefois, certaines protéines Rho présentent une expression « tissu spécifique ». Par exemple, Rac-2 est essentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques [87 , 88]. Les GTPases Rho peuvent également être régulées au niveau transcriptionnel : RhoB et RhoG sont par exemple des gènes de réponse précoce aux facteurs de croissance [89 , 90]. Nous détaillerons plus loin (partie IV) que l'expression de RhoB peut également être induite par différents facteurs. Les membres de la sous famille Rnd ne possèdent pas d'activité GTPasique et seraient principalement régulés *via* leur niveau d'expression [91].

3. Localisation subcellulaire

Les GTPases Rho ont une localisation subcellulaire très variée traduisant une grande diversité des fonctions auxquelles elles participent. Plusieurs travaux ont montré que les GTPases Rho sont présentes dans le cytoplasme, à la membrane plasmique, au niveau de l'appareil de Golgi, des endosomes précoces et tardifs, et dans le noyau [92 , 93 , 94 , 95 , 96]. Les protéines Rac 1 et Cdc 42 sont retrouvées essentiellement au niveau de l'enveloppe nucléaire, du reticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

RhoA et RhoC sont, quand à elles, majoritairement cytoplasmique. Toutefois, il a été mis en évidence récemment une distribution péri-nucléaire de RhoA activé [97]. RhoB, quant à lui, est localisé au niveau des endosomes, de la membrane plasmique et de l'appareil de Golgi [92 , 98 , 99]. RhoB pourrait également être localisé dans le noyau ou dans la région péri-nucléaire [100 , 101].

4. Les modifications post-traductionnelles

Ces modifications incluent la prénylation, la protéolyse, la carboxyméthylation et la palmitoylation. Elles sont nécessaires pour la localisation et les fonctions biologiques des protéines Rho [102].

La prénylation est une modification post-traductionnelle irréversible qui consiste en l'ajout *via* une liaison thioéther d'un lipide isoprénique : soit un farnésylpyrophosphate, soit un géranylgeranylpyrophosphate, sur une séquence consensus appelé boîte de type CAAX (C pour cystéine, A pour acide aminé aliphatique et X pour acide aminé quelconque) située à l'extrémité C-terminale de ces protéines (Figure 9). Trois enzymes peuvent effectuer ce « greffage covalent » : la farnésyltransférase (FTase), la géranylgeranyltransférase I (GGTase I) et la géranylgeranyltransférase II (GGTase II). La FTase et la GGTase I reconnaissent les protéines qui possèdent un motif CAAX alors que la GGTase II reconnaît les motifs XCC ou CXC [103]. Pour les protéines à motifs CAAX, le choix de l'isoprène est choisi en fonction de la nature de l'acide aminé X [104]. Lorsque l'acide aminé X est une sérine ou une méthionine, la FTase ajoute un farnésyl alors que si cet acide aminé est une leucine, la GGTase I ajoute un géranylgeranyl. Après ajout des groupements isoprènes, le tripeptide AAX de la boîte consensus CAAX subit une protéolyse, ce qui amène la cystéine en position C terminale.

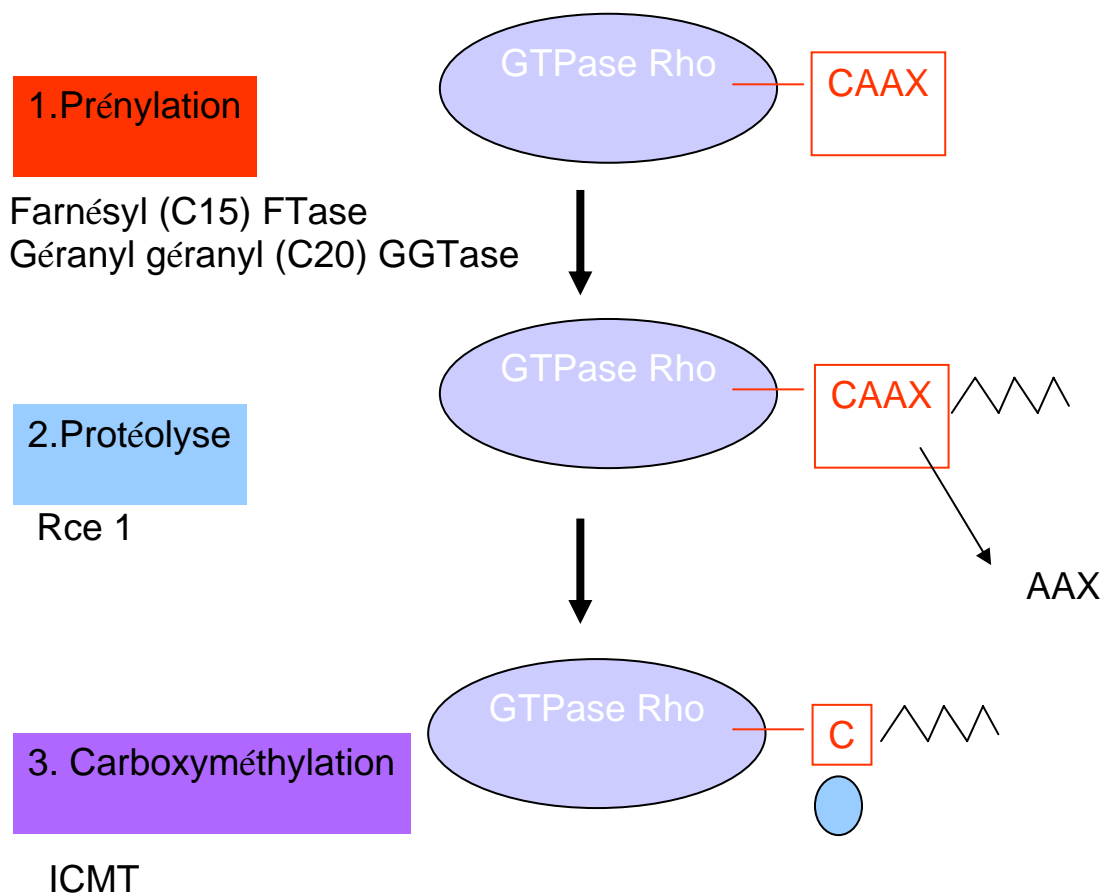


Figure 9 : Modifications post-traductionnelles des protéines Rho au niveau COOH terminal.

1. Les Farnésyltransférases (FTase) ou géranyl-géranyltransférases (GGTase) ajoutent le groupement prényl sur la séquence CAAX de la protéine.
 2. Une digestion endoprotéolytique est réalisée par l'endopeptidase Rce-1.
 3. Une méthylation de la cystéine est réalisée par la carboxy-méthyl-transférase (ICMT).
- D'après Walker and Olson, *Curr Opin Genet Dev*, 2005

Cette cystéine peut alors être le substrat d'une carboxyméthyltransférase (Icmt). De nombreuses protéines ainsi prénylées seront également palmitoylées, ce qui est le cas de RhoB. Cette palmitoylation est nécessaire pour l'adressage à la membrane. L'ensemble de ces modifications est nécessaire à l'activité biologique, à l'adressage à la membrane ainsi qu'à l'interaction protéine/protéine des GTPases Rho.

5. Cycle d'activation/inactivation des protéines Rho

Les GTPases Rho cyclent entre un état actif lié au GTP et un état inactif lié au GDP (Figure 10). Le passage entre les différents états se fait grâce à des régulateurs. Il existe 3 types de protéines régulatrices. Les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) qui stimulent l'échange du GDP par le GTP, favorisant ainsi l'apparition de la forme active. Les GAP (GTPases Activating Proteins) qui stimulent l'activité GTPasique intrinsèque, permettant un retour à une forme liée au GDP et donc inactive. Les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) interagissent avec la forme liée au GDP en masquant le prényl ce qui permet le maintien de la protéine sous sa forme inactive [80].

a. Les Guanosine Exchange Factor: GEFs

Les GEF sont essentiellement représentés par la famille Dbl dont 69 membres sont identifiés (Vav, LARG, p115 RhoGEF, Tiam1, Trio, ...) [105 , 106]. Ces protéines se caractérisent par un domaine conservé appelé domaine DH (Dbl-Homology) nécessaire à l'activité GEF [107]. En revanche, deux autres familles de GEF, ne présentant pas de domaine DH, ont été identifiées : les protéines de la famille DOCK [108 , 109] et de la famille SWAP [110]. L'interaction entre le domaine DH du GEF et les domaines switch 1 et switch 2 de la GTPase chargée en GDP, déstabilise le complexe GDP/GTPase au profit de la stabilisation d'un

intermédiaire réactionnel sans nucléotide. Du fait du fort ratio intracellulaire GTP/GDP, le GDP est déplacé par une molécule de GTP [111].

La notion de spécificité de ces GEF vis-à-vis des différents membres de la famille des GTPases Rho n'est pas encore bien définie [105 , 112]. Certains possèdent une activité très spécifique pour une seule GTPase, comme p115, Lbc, Lcf ou Lcs (pour Rho), Tiam-1 (pour Rac) ou Fgd1 (pour Cdc42). D'autres peuvent activer plusieurs types de GTPases Rho, comme Vav1 (pour Cdc42, Rac et Rho), Dbl (pour Rho et Cdc42) ou Trio (pour Rac et Rho). L'activité des GEF semble être régulée par divers mécanismes incluant des interactions protéine-protéine, notamment avec des protéines G hétéro-trimériques ou des petites protéines G, leur phosphorylation ou encore la régulation de leur localisation subcellulaire [106].

b. Les GTPase Activating Proteins : GAPs

Il existe environ 70 protéines à activité RhoGAP codées dans le génome humain (p190A RhoGAP, p190B RhoGAP, GRAF 1 et 2, DLC-1, ArhGAP6, BCR...) [113 , 114]. Ces RhoGAPs ont été décrites par homologie de leur domaine RhoGAP ou domaine BH (BCR-Homology) [115]. Le domaine RhoGAP interagit avec les régions Switch 1 et Switch 2, et avec le domaine de liaison du GTP de la GTPase Rho. Le résidu arginine conservé du domaine GAP interagit avec le site actif de la GTPase au contact du résidu glutamine dans le switch 2. Cette structure stabilise la GTPase Rho sous une conformation facilitant l'hydrolyse GTPasique intrinsèque [116]. La spécificité des RhoGAP caractérisées est faible. Leur spectre d'action pour les membres de la famille Rho *in vitro* est large. L'abondance des RhoGAP par rapport aux GTPases Rho, suggère fortement que les RhoGAP jouent aussi un rôle dans la spécificité des fonctions des Rho GTPases qu'elles régulent. L'activité des RhoGAP semble être régulée par divers mécanismes, incluant des interactions protéine-protéine, leur interaction avec des

phospholipides, leur phosphorylation, leur translocation subcellulaire ou encore leur dégradation protéolytique [117].

c. Les Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors : GDIs

À la différence des RhoGEF et des RhoGAP, peu de RhoGDI sont connus. Trois isoformes, présentant une forte homologie de séquence ont été décrites à ce jour : RhoGDI-1 (α), dont l'expression est ubiquiste [118 , 119], RhoGDI-2 (β), appelé aussi D4-GDI ou LYGDI, exprimé spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques [120] et RhoGDI-3 (γ), exprimé essentiellement dans le cerveau, mais aussi dans les poumons et les testicules [121 , 122]. Les GDI sont constitués de deux domaines fonctionnels : un domaine N-terminal responsable de l'inhibition de la dissociation du GDP (liaison au Switch1), et un domaine C-terminal impliqué dans la liaison à la GTPase (liaison au switch 2). Ce dernier adopte une structure ordonnée de type immunoglobuline, formant une poche hydrophobe dans laquelle se niche le lipide isoprénique de la GTPase. Outre leur rôle dans l'inhibition de la dissociation du GDP, les RhoGDI jouent aussi un rôle crucial dans la translocation cytoplasme/membrane des GTPases Rho [123]. Ils sont capables d'extraire des membranes la Rho GTPase liée au GDP en se liant notamment à son extrémité C-terminale, masquant ainsi le lipide isoprénique hydrophobe, et maintenant la GTPase sous une forme soluble inactive dans le cytosol [124 , 125 , 126 , 127]. Par ailleurs, si RhoGDI se lie préférentiellement aux GTPases Rho sous leur forme inactive liée au GDP, il est également capable de lier les formes GTP de Rho, Rac et Cdc42 [128 , 129 , 130]. Cette liaison, même faible, a pour conséquence l'inhibition de l'activité GTPasique intrinsèque et GAP-induite des GTPases Rho. Des travaux suggèrent que RhoGDI-1 régule aussi *in vivo* l'activité de la GTPase RhoA liée au GTP [131]. Récemment, il a été mis en évidence que la régulation des protéines RhoGDIs est importante pour leur contrôle de l'activité des Rho GTPases. Par exemple, la phosphorylation de RhoGDI par la PKC ou Pak1

diminue fortement l'affinité de RhoGDI pour Rac-1[131]. De plus, Src en phosphorylant RhoGDI entraîne une diminution de l'affinité de la protéine RhoGDI pour les Rho, ce qui probablement prolonge la période d'activation de la protéine Rho [132]. Une autre étude montre que la déplétion en RhoGDI favorise la dégradation de la fraction géranylgeranylée des protéines Rho alors qu'elle favorise l'activité des Rho ancrées à la membrane [130].

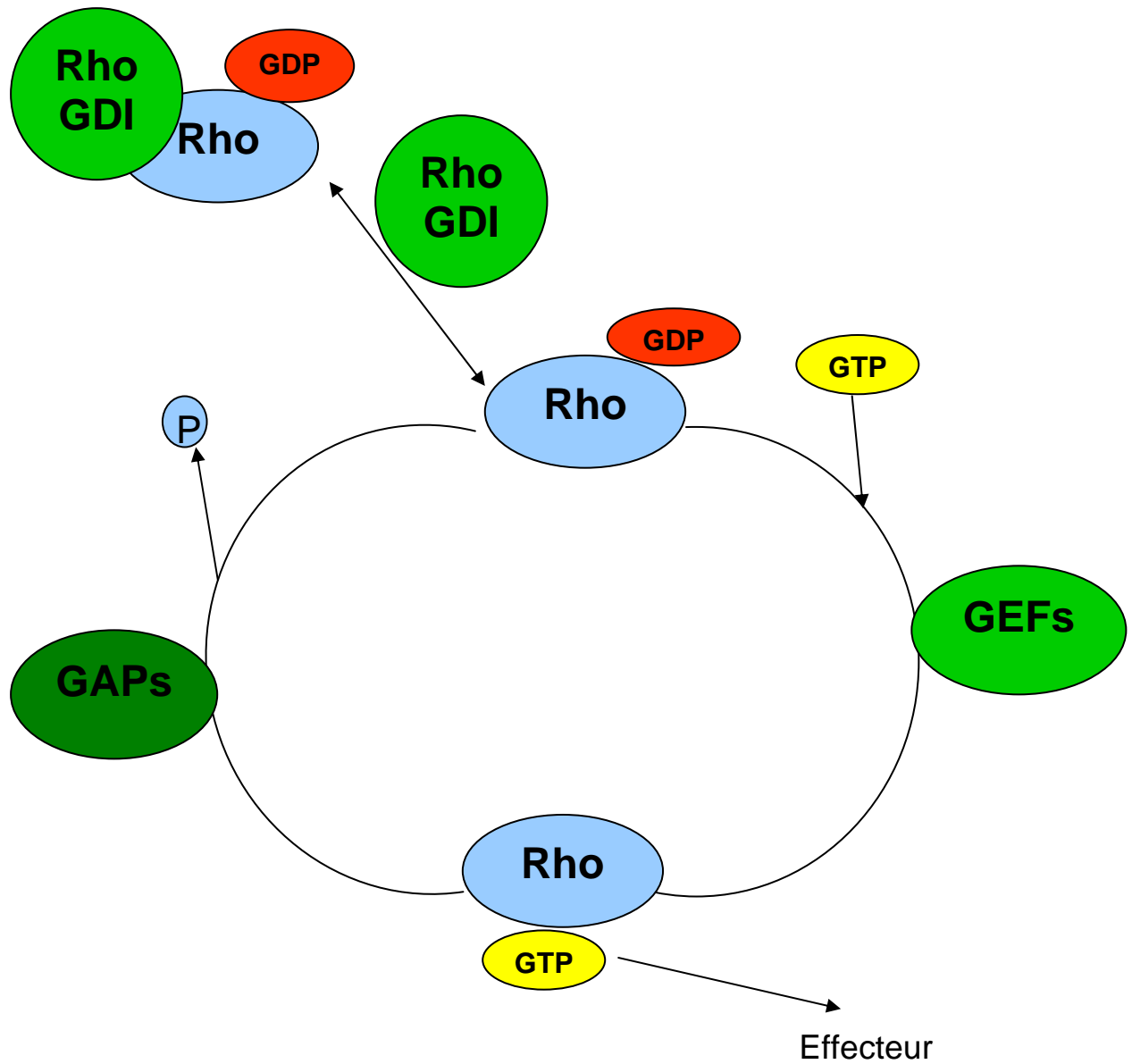


Figure 10 : Cycle d'activation des petites GTPases de la famille des protéines Rho

Le passage entre l'état actif lié au GTP et l'état inactif se fait par des GAPs. L'inverse est effectué par les GEFs. Les protéines Rho peuvent être séquestrées dans le cytoplasme par des GDIs

6. Effecteurs

Une fois activées et situées à leur localisation subcellulaire, les protéines Rho interagissent avec des effecteurs afin de déclencher des cascades de signalisation. Plus de 70 effecteurs des protéines Rho ont été identifiés. Ils ont été classés en différentes classes en fonction de leur homologie structurale [133 , 134].

La classe I regroupe la famille des ROCK kinases. Les effecteurs de cette classe possèdent un domaine kinase et un domaine PH (Pleckstrin Homology domain). Il comprend entre autres les deux isoformes de ROCK I et II (Rho-associated Coiled-coil forming Kinase) et citron-K.

La seconde classe regroupe les effecteurs mDia (mDia1, mDia2, mDia3). Les protéines mDia possèdent toutes un domaine RBD (Rho Binding Domain) et 3 domaines FH (Formin Homology domain).

La dernière classe contient les protéines qui ont un motif PKN/Rhopilin. Ce motif contient une partie du domaine RBD. Parmi les protéines de cette classe, les principales sont la Rhophiline, PKN et la rhotéchine.

Les effecteurs ROCK et mDia sont les plus connus et permettent l'action des protéines Rho sur le cytosquelette d'actine : mDia permet la production des filaments d'actine *via* la nucléation et la polymérisation des monomères d'actine, ROCK quant à lui permet l'ancrage de la myosine sur les filaments d'actine et ainsi la contraction.

7. Fonctions

a. GTPases Rho et cytosquelette d'actine

Grace à l'utilisation de mutants dominants négatifs et de mutants constitutivement actifs de Rho, Rac et Cdc 42, le rôle de ces protéines a été mis en évidence dans la formation de fibres de stress, de points focaux d'adhésion, des lamellipodes et des filopodes [132 , 135 , 136 , 137].

Ces études ont montré que les protéines Rho sont au centre de processus cellulaires dépendants de l'actine, tels que la morphologie, la polarité, l'adhésion et la motilité des cellules. Par exemple, l'activation de RhoA par l'acide lysophosphatidique entraîne la formation de fibres de stress d'actine et de points focaux d'adhérence qui sont responsables de la forme de la cellule et de son ancrage à la matrice extracellulaire [138, 139]. A l'inverse, les GTPases RhoE/Rnd3 et Rnd1 inhibent la formation de fibres de stress et de points focaux d'adhérence induits par RhoA [140, 141]. L'activation de Rac par des facteurs de croissance comme le PDGF, l'EGF ou l'insuline conduit à la formation de replis membranaires appelés ruffles et de lamelipodes. L'activation de Cdc42, notamment par la bradykinine induit quant à elle la formation de longs et fins prolongements appelés filopodes.

RhoA participe à la migration cellulaire en assurant notamment la déstabilisation des points d'adhésion à la matrice et la contraction de l'arrière de la cellule [142]. Cdc42 serait principalement impliqué dans l'établissement de la polarité et Rac jouerait le rôle moteur de polymérisation de l'actine à l'avant des cellules, produisant une force d'expansion cellulaire responsable de la migration [143].

b. GTPases Rho et trafic cellulaire

Les GTPases Rho ont aussi été impliquées dans le trafic membranaire et intracellulaire. Ainsi, les GTPases Rho jouent un rôle essentiel dans les mécanismes d'endocytose indépendants de la clathrine, qui sont des voies d'endocytose dépendantes de la polymérisation de l'actine. Rac et Cdc42 semblent essentielles à la phagocytose de type 1. RhoA participe spécifiquement à la phagocytose facilitée par la fraction C3 du complément (phagocytose de type 2) [144, 145]. Les GTPases Rho participent aussi à l'endocytose dépendante de la clathrine, mais ne sont pas essentielles à son déroulement [145]. RhoA et Rac interviendraient *via* leur activité sur la production de PIP₂, conduisant à la transformation des vésicules de clathrine en endosomes

précoces. Cdc42 interviendrait au moment de la formation des vésicules de clathrine [145]. RhoA pourrait également inhiber l'internalisation des récepteurs en les séquestrant au niveau des cavéoles et loin des puits de clathrine [146]. Plusieurs GTPases Rho sont aussi localisées au niveau de certains compartiments vésiculaires, suggérant qu'elles puissent agir sur certaines étapes du trafic endocytaire.

c. GTPases Rho, transcription, prolifération et survie cellulaire

Divers travaux ont montré que les GTPases Rho sont également impliquées dans la régulation de nombreux facteurs de transcription tels que SRF, NFκB, E2F-1, c-Jun, ATF-2, elk-1, AP-1 et Stat3, leur conférant ainsi un rôle dans le contrôle de l'expression génique [147]. Rho, Rac et Cdc42, sous leur forme constitutivement active, sont ainsi capables d'activer notamment les voies JNK (C-Jun N-terminal Kinases) et p38 [148 , 149 , 150]. Plusieurs travaux ont aussi mis en évidence un rôle positif des protéines Rho, Rac et Cdc42 dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire [151 , 152 , 153 , 154]. Par exemple, RhoA et Rac-1 stimulent la transcription de la cycline D1 et RhoA peut inhiber l'expression de deux régulateurs négatifs de la transition G1/S : p21^{WAF/CIP1} et p27^{KIP1} [155 , 156]. Les GTPases Rho ont aussi été impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire. RhoA, RhoC et Rac sont capables d'induire l'apoptose dans différents types cellulaires après privation en sérum, *via* un mécanisme, indépendant de p53, conduisant à la production de céramides [157]. Rac est aussi requis pour l'apoptose induite par Fas [158] et par le TNFα. RhoB, lui, est nécessaire à l'apoptose des cellules transformées traitées par certains génotoxiques, comme le paclitaxel ou les inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI) (classe d'agents anti-cancéreux développée à l'origine pour bloquer la fonction de la protéine oncogénique H-Ras, en inhibant sa farnésylation) [159 , 160 , 161]. Cependant, les GTPases Rho peuvent également conduire à l'activation de signaux de

survie. Par exemple, Rac peut activer des voies de survie dans des cellules transformées, les protégeant ainsi de l'apoptose [162 , 163].

9. GTPases Rho et oncogénèse

a. GTPases Rho et cancers

Les GTPases Rho participent à diverses fonctions cellulaires (adhérence/migration, survie, prolifération) souvent mises en jeu dans le processus de transformation cellulaire [164 , 165 , 166 , 167] et semblent donc être bien impliquées dans la tumorigénèse. Des dominants négatifs de ces GTPases Rho sont capables d'inhiber la transformation de fibroblastes induite par Ras. Inversement, des mutants constitutivement actifs de nombreuses GTPases Rho sont capables d'induire ou de potentialiser la transformation cellulaire [168]. Les diverses études visant à déterminer leur statut au sein des tumeurs, n'ont pas mis en évidence de mutations activatrices, sauf pour la GTPase RhoH [169]. Néanmoins, plusieurs GTPases Rho ont été retrouvées surexprimées ou suractivées dans différents types de tumeurs, notamment Rac-1b [170 , 171], Rac3 [172], RhoC [173 , 174], RhoA, Rac et Cdc42 [175 , 176]. D'autre part, quelques altérations génétiques ont été mises en évidence dans des gènes codant des RhoGEFs ou des RhoGAPs, comme Tiam-1, GRAF, p190 RhoGAP et DLC-2 [142, 177]. La contribution oncogénique de certaines GTPases pourrait donc être aussi le résultat de l'altération de l'activité de leurs régulateurs. De nombreux arguments tendent aujourd'hui à conférer aux GTPases Rho un rôle important dans les mécanismes régulant la migration et l'invasion cellulaire. Les GTPases Rho contribuent notamment à l'altération des jonctions cellulaires, rencontrée dans les tumeurs [178 , 179]. RhoA et Rac participent aussi à la dégradation de la matrice extracellulaire en agissant notamment sur la balance entre métalloprotéinases (MMP) et leurs inhibiteurs (TIMP) [180 , 181]. RhoC induit aussi la sécrétion de facteurs angiogéniques, facilitant ainsi la vascularisation de la tumeur [182]. Des études montrent

l'implication de la GTPase RhoC dans le potentiel métastatique de mélanomes *in vivo* [174] et *in vitro* [183]. Des souris n'exprimant plus RhoC (RhoC *-/-*) présentent un développement normal des tumeurs. En revanche, la motilité des cellules tumorales et la survie des cellules métastatiques sont diminuées menant à une diminution du nombre de métastases [184]. Nous reviendrons dans le paragraphe suivant sur le rôle de RhoC dans les cancers du sein inflammatoires. Néanmoins, certaines GTPases Rho, comme RhoB, RhoBTB2 et RhoE semblent avoir un rôle antagoniste sur la transformation cellulaire [185, 186]. Le cas de la protéine RhoB, très étudiée au laboratoire, sera abordé en détail dans le chapitre suivant (chapitre V).

L'expression des RhoGDIs est également altérée dans de nombreux cancers [187].

b. GTPases Rho et cancers du sein

A ce jour, aucune mutation des protéines Rho n'a été décrite dans les cancers du sein [159]. Cependant, une corrélation entre la surexpression des protéines Rho et un mauvais pronostic a été démontrée [188]. De plus, le microARN-31 (miR-31) supprime les métastases du cancer du sein *via* une diminution de l'expression de Rho [189]. Ces résultats concordent avec ceux de l'équipe de Chan qui a montré récemment que le complexe transcriptionnel Myc-Skp2-Miz1 est indispensable pour la transcription du gène RhoA, l'invasion cellulaire ainsi que la formation de métastases [190]. Très récemment, le rôle de RhoA sur la migration et la prolifération induite par l'E₂ et l'implication des RE a été étudié dans des cellules endothéliales [191]. Cette étude a montré grâce à l'utilisation d'ICI 182 780 et d'un inhibiteur de ROCK (Y 27 632), que l'E₂ active la voie RhoA/ROCK et augmente ainsi l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire comme la cycline D1/Cdk4 (phase G1) et la cycline A2/Cdk2 (phase S).

Cependant, comme dans d'autres tumeurs solides (notamment bronchiques), ces GTPases sont parfois surexprimées ou hyperactives dans les tissus cancéreux de la glande mammaire [14, 15]. Fritz a tout d'abord rapporté que le taux d'expression des protéines RhoA, Rac et Cdc42 est plus élevé dans le tissu tumoral mammaire que dans le tissu sain et que celui de RhoA est d'autant plus élevé que le grade tumoral est lui aussi élevé [192]. Ces travaux suggèrent que la surexpression des protéines Rho, et en particulier de RhoA, est un évènement précoce et fréquent dans la cancérogenèse mammaire. La même équipe [14] a observé sur une série de tumeurs mammaires une surexpression des protéines RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42 et Rac1 par rapport au tissu sain sans augmentation des ARNm correspondants. Ils ont également montré que le niveau d'expression de RhoA en particulier, mais aussi de RhoB et RhoC, est corrélé au degré de malignité (qui prend en compte le grade SBR et l'index de prolifération). Ces observations suggèrent que ces trois protéines sont impliquées dans la prolifération et l'agressivité de la tumeur. Par contre, dans cette même étude, le niveau d'expression de ces protéines Rho n'est pas corrélé au statut de p185^{erbB2}, à l'expression des RH, ni à une mutation de p53. Sur une série de 120 tumeurs mammaires et 32 tissus mammaires sains, Jiang et son équipe ont analysé l'expression, par immunohistochimie, des protéines RhoA, RhoB, RhoC, RhoG, Rho-6, Rho-7 et Rho-8 ainsi que les niveaux des ARNm codant RhoGDI et RhoGDI γ [193]. Cette étude montre que les taux d'expression de RhoC, Rho-6 et Rho-G sont nettement plus élevés dans les carcinomes que dans les tissus sains. Ils montrent également qu'à l'inverse, les taux de RhoA, RhoB, Rho-7 et Rho-8 sont identiques dans les tissus mammaires tumoraux et sains. Le taux de RhoGDI γ , un régulateur des Rho, est également plus faible dans les carcinomes que dans les tissus sains.

Alors que la protéine Ras régule positivement les effets du RE α sur la transcription [194], les travaux de Su et son équipe suggèrent un rôle inverse des protéines Rho. En effet, la forme constitutivement active de RhoA, Cdc42 ou Rac1 entraîne dans plusieurs modèles, dont les

cellules MCF-7, une régulation négative des effets du RE α comme du RE β sur la transcription de gènes qui ont dans leur promoteur une séquence consensus ERE. L'hyperexpression de RhoGDI α ou le traitement de cellules MCF-7 par la toxine C3 transférase de Clostridium botulium, qui inhibe l'activité des 3 protéines RhoA, RhoB et RhoC, abolit cet effet. Par contre, ces mêmes auteurs n'observent aucune régulation de la transcription dépendante de l'ERE [195]. Dans notre laboratoire, en utilisant ce même inhibiteur spécifique des protéines RhoA, RhoB et RhoC, il a été mis en évidence qu'au moins une de ces protéines Rho a un effet négatif sur la transcription dépendante du RE. Par ailleurs, il a été prouvé que des protéines prénylées modifient l'équilibre des co-régulateurs associés au RE α et en particulier le coactivateur SRC-1 [196, 197].

Plusieurs travaux suggèrent que RhoC joue un rôle important dans la cancérogenèse des cancers du sein dits inflammatoires. Ce type de cancer représente environ 5% de la totalité des cancers mammaires et se caractérise par une agressivité et un caractère invasif très marqués. RhoC est en effet surexprimé dans 90% de ces cancers contre seulement 36% dans des tumeurs non inflammatoires [198]. RhoC est impliqué dans des processus angiogéniques et d'invasion : il entraîne une augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le bFGF [182, 199]. Une autre étude montre que WISP3 (WNT-1 induced secreted protein 3), protéine impliquée dans l'angiogénèse et l'invasion régulerait l'expression de RhoC. En effet, dans des cellules SUM149 (qui présentent le phénotype des cancers du sein inflammatoires), une perte d'expression de WISP3 et une augmentation du taux de RhoC sont observées par rapport à des cellules épithéliales mammaires [200]. La même équipe [201] montre que l'utilisation d'un inhibiteur de farnésyltransférase, le FTI-L744, 832 réverse le phénotype de cancer du sein inflammatoire induit par la surexpression de RhoC. Cette réversion serait due à une augmentation du taux de RhoB sous sa forme géranylgeranylée, dans la mesure où RhoC n'est pas farnésylé. D'autres suggèrent que les récepteurs à activité tyrosine

kinase transmembranaires, souvent surexprimés dans ces cancers, pourraient activer des GEFs tels que Vav, qui à leur tour favoriseraient l'activation de protéines telles que RhoC (en favorisant l'échange GDP/GTP) [202].

Enfin, deux études montrent que les cellules métastatiques expriment plus fréquemment un taux élevé de RhoC que les cellules de tumeurs mammaires primitives non inflammatoires [174, 203]. Ceci a également été retrouvé dans 280 tumeurs de cancers du sein inflammatoires. Cette étude montre que le taux de RhoC est d'autant plus élevé que le grade de la tumeur est élevé. De plus, une corrélation entre cette forte expression un mauvais pronostic et une absence des récepteurs hormonaux ont été faite. Récemment, il a été mis en évidence que RhoA et RhoC jouent des rôles différents dans des lignées RE négatives (MDA-MB31) et des lignées issus de cancer du sein inflammatoires (SUM 149). Dans cette étude, RhoC joue un rôle négatif dans l'adhésion et les métastases des cancers du sein. Ce rôle est dû à une modulation de l'expression des intégrines $\alpha 2\beta 1$ [204].

c. Régulateurs des GTPases Rho et cancers du sein

Plusieurs régulateurs des protéines Rho semblent intervenir dans les cancers du sein. En effet, l'expression par exemple de GEFs a été recherchée dans ces tumeurs. Ainsi, Lane et son équipe ont recherché l'expression et la valeur pronostique de Trio, Vav1 et TIAM-1 dans les cancers du sein [205]. De cette étude est ressortit que TIAM-1 et Vav1 sont surexprimés dans les tissus tumoraux par rapport au tissu sain et que cette surexpression serait un facteur de bon pronostic. Une autre GEF a également été étudiée. Il s'agit de MyoGEF (Myosin interacting guanine exchange factor) dans des lignées cellulaires de cancers du sein [206]. MyoGEF, surexprimé dans des cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-435S, régulerait l'invasion de ces cellules *via* l'activation de RhoA et RhoC. L'équipe de Rubino a également caractérisé une autre GEF, Brx (appartenant à la famille Dbl) qui pourrait moduler l'action du RE α [207].

Les GAP peuvent également jouer un rôle dans la motilité et l'invasion des cellules de carcinome mammaire. L'équipe de Shen a en effet montré la formation d'hétérodimères p190rhoGAP et p120 RasGAP qui pourraient jouer ce rôle [208]. L'héréguline peut selon eux conduire à la phosphorylation de RAFTK (Focal Adhesion Related Kinase). Le complexe RAFTK, Her2/Neu, P190 RhoGAP et p120 Ras GAP est impliqué dans la motilité et l'invasion des cellules de cancers du sein.

Deux études suggèrent que les RhoGDI pourraient également intervenir dans les cancers du sein. Tout d'abord, D4-GDI, qui est préférentiellement exprimé dans les tissus hématopoïétiques comme les cellules T et B (alors que RhoGDI a une expression ubiquitaire), se retrouve exprimé fortement dans des lignées de cancers du sein à haut pouvoir invasif comme les MDA-MB-231[209]. Cette étude montre que la suppression de D4-GDI est associée à une régulation négative de l'expression de l'intégrine $\beta 1$ et à une perte de l'adhésion de la cellule à une matrice. Ceci suggère que D4-GDI induit l'invasion cellulaire en contrôlant l'expression de l'intégrine $\beta 1$. El Marzouk et son équipe ont, quand à eux, étudié les interactions entre RhoGDI α et le RE α [210]. Après avoir mis en évidence une interaction directe entre ces deux protéines, ils ont montré que RhoGDI α altère l'interaction entre le RE α et les ERE de gènes cibles et enfin que la capacité de RhoGDI α à interagir avec le RE α influence la capacité du récepteur à réguler la transcription de gènes.

L'ensemble de ces données montre que non seulement les protéines Rho jouent un rôle dans les cancers du sein et que la part de leurs régulateurs dans ce processus n'est pas à négliger.

10. Les inhibiteurs de Farnésyl Transférase (FTIs)

a. Les inhibiteurs de farnésylation

La farnésylation de Ras étant nécessaire pour lui conférer son activité transformante, plusieurs laboratoires ont développé, depuis plus de 15 ans, des inhibiteurs de FTase dans le but de développer des traitements anti tumoraux ciblant les tumeurs présentant des mutations de Ras. Dans cet objectif, plusieurs stratégies ont été développées et de nombreux composés ont été isolés. La FTase est capable de reconnaître des térapeptides de type CAAX et de les farnésyler aussi efficacement que la protéine entière [211]. Ainsi, une stratégie visant à produire des inhibiteurs analogues de cette séquence (ou peptidomimétiques) a été développée. Par ailleurs, des inhibiteurs compétitifs du farnésyl diphosphate (FPP), second substrat de la FTase ont également décrits. Ils sont plus communément appelés analogues de farnésyl diphosphate, avec par exemple la forme non hydrolysable du FPP, l'acide phospho- α -hydroxyfarnésyl qui possède *in vitro* une CI50 de l'ordre de 5×10^{-9} M [212].

Des inhibiteurs de farnéyltransférase appelés bisubstrats ont également été élaborés. Ces analogues bisubstrats incorporent dans leur structure à la fois des motifs FPP et CAAX et ont démontré *in vitro* une forte efficacité [213]. Enfin, une autre approche a été développée avec le criblage de composés issus de produits naturels ou de synthèse chimique.

b. Les FTIs et cancer

Au sein du laboratoire, il a été montré que le FTI-277 est capable d'augmenter de façon additive l'action du tamoxifène [214] dans des cellules MCF-7. Cette étude montre que l'ajout de ce FTI-277 et du tamoxifène dans des cellules MCF-7 augmente l'inhibition de la prolifération observée avec le tamoxifène seul (effet additif) ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire (phase G0/G1) par un recrutement préférentiel des inhibiteurs de cdk p21^{WAF/CIP1} et à moindre degré de p27^{kip1}. Cette étude a été élargie à l'utilisation d'un autre FTI utilisé en

clinique, le R115,777 et les mêmes résultats d'inhibition de prolifération ont été confirmés que ceux obtenus avec le FTI-277. Il a également été mis en évidence dans cette étude une augmentation de l'apoptose lorsque le FTI est associé avec un anti-œstrogène (tamoxifène ou ICI 182,780) ou un ligand du site AEBS [215].

Basée sur ces résultats cellulaires, une étude clinique de phase II, réalisée sur 21 patientes résistantes au tamoxifène et traitées par l'association tamoxifène/tipifarnib (R115, 777) a été menée au laboratoire [29]. Le tipifarnib (Zarnestra ®) est l'un des premiers inhibiteurs de farnésyltransférase utilisé dans des essais cliniques. Il a été développé par les laboratoires Janssen-Cilag. Une seule réponse objective a été obtenue mais 9 patientes ont bénéficié d'une stabilisation de leur maladie. L'analyse protéomique par SELDI-TOF a identifié un peptide du fibrinogène α augmenté dans le sérum prélevé à 2 mois des patientes dont la maladie progresse par rapport au sérum des patientes qui ont présenté un bénéfice clinique. Un autres essai de phase II, utilisant le tipifarnib, mais associé avec une chimiothérapie (Doxorubicine et cyclophosphamide) a été conduit et fait l'objet d'une publication [216]. Le tipifarnib augmente également le nombre de réponses complètes dans cette étude.

Les effets des FTIs sont également étudiés dans d'autres tumeurs. En effet, au sein du laboratoire, une équipe s'est intéressée à l'effet radiosensibilisant des FTIs dans les glioblastomes [217, 218]. Un traitement par le FTI-277 radiosensibilise les tumeurs obtenues par xénogreffes de glioblastomes effectuées chez des souris à déficience immunitaire (NUDE).

IV. La petite GTPase RhoB

RhoB est une petite protéine G de 196 acides aminés appartenant à la famille des GTPases Rho. RhoA, RhoB et RhoC présentent 85% d'homologie de séquence en acides aminés. La plus forte homologie de séquence se situe dans la région N-terminale, notamment au niveau des domaines Switch et du domaine de liaison au GTP. C'est la région C-terminale, dite région hypervariable, qui contient l'essentiel des différences de séquences entre les trois protéines qui sont néanmoins codées par des gènes distincts que ce soit chez l'homme, le rat ou la souris [219]. Les gènes *rhoA* et *rhoC* sont localisés respectivement sur les chromosomes 3 et 1 et le gène *rhoB* est localisé sur le chromosome 2. La protéine RhoB présente des caractéristiques biochimiques et biologiques qui la distinguent de RhoA et RhoC [220] et qui pourraient expliquer certaines de ses fonctions spécifiques dans divers processus cellulaires.

1. Régulation de l'expression de RhoB

À la différence de RhoA et de RhoC, RhoB se caractérise par une demi-vie courte (une à deux heures) [89, 221]. De plus, son gène est considéré comme un gène de réponse précoce aux facteurs de croissance et aux stress génotoxiques tels que les UV [222].

a. Le cycle cellulaire

L'expression de l'ARNm et de la protéine RhoB semble être régulée au cours du cycle cellulaire. Il a été mis en évidence que le taux de la protéine RhoB était augmenté pendant la transition entre les phases G1 et S dans des cellules HeLa, pour atteindre un maximum d'expression en phase S [100]. Il a été également décrit que l'expression basale de RhoB est régulée de manière cellule- et tissu-spécifique [192].

b. Les facteurs de croissance

L'expression de RhoB est induite par l'EGF et le PDGF dans divers types cellulaires [89 , 223]. Suite à une stimulation par l'EGF, les taux d'ARNm et de protéine RhoB sont rapidement augmentés [100]. Cette induction serait seulement due à la stabilisation des ARNm de RhoB [224]. Plusieurs études ont montré que l'expression de RhoB est également induite par le TGF β , impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et dans la transition épithélio-mésenchymateuse [225 , 226 , 227]. Cette induction de RhoB par le TGF β est due exclusivement à l'accumulation de la protéine, *via* l'inhibition de son ubiquitination et de sa dégradation par le protéasome [226]. Néanmoins, les résultats obtenus par l'équipe de Xie suggèrent que le TGF β peut aussi induire une augmentation du taux d'ARNm de RhoB dans certains types cellulaires [227].

c. Les GTPases Rho

L'expression de RhoB semble également être modulée par d'autres GTPases Rho *via* un rétrocontrôle transcriptionnel. L'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoA, ou de RhoB, entraîne l'inhibition du promoteur murin de *rhoB* alors que la surexpression de RhoGDI-1 se traduit par une activation du promoteur [228]. Une autre étude montre que la forme de RhoA liée au GDP régule la stabilité de RhoB [229].

d. Les stress génotoxiques

L'expression de RhoB est induite par divers agents causant des dommages à l'ADN tels que les rayonnements UVC, UVB, ou les agents chimio-toxiques (cisplatine, agents alkylants) [159 , 221 , 222, 228]. L'induction de RhoB sous UVC dans les cellules NIH-3T3 résulterait à la fois d'une activation transcriptionnelle [230] et d'une stabilisation de l'ARNm [231]. Les travaux conduits au sein de notre laboratoire ont également mis en évidence que l'activation et

l'expression de RhoB est augmentée après irradiation aux UVB. Ce phénomène est expliqué par une augmentation de l'activité du promoteur de RhoB ainsi que par une stabilisation accrue de l'ARNm [222].

e. Les glucocorticoïdes

Récemment, une étude a montré que les glucocorticoïdes, et en particulier la dexaméthasone, induisent l'expression de RhoB au niveau protéique et ARNm de façon dose- et temps-dépendant *via* le récepteur des glucocorticoïdes. Ces travaux décrivent également que l'activation ou la surexpression de RhoB augmentent l'activité du facteur de transcription NF-KappaB dans des cellules de cancers ovariens humains, HO-8910 [232].

2. Modifications post-traductionnelles de RhoB

a. La prénylation

Contrairement à RhoA et RhoC, qui existent exclusivement sous forme géranylgeranylée, la protéine RhoB possède une séquence C-terminale de prénylation -CKVL, qui lui permet d'être soit farnésylée soit géranylgeranylée [233 , 234 , 235 , 236]. Des travaux réalisés au sein de notre laboratoire [98] et ceux de l'équipe de H. Mellor [237] suggèrent que la localisation de RhoB dépend de la nature de la prénylation. En effet, dans les cellules murines NIH-3T3, un mutant de RhoB exclusivement géranylgeranylable (RhoB-GG) présente une localisation préférentiellement vésiculaire tandis que le mutant exclusivement farnésylable (RhoB-F) est localisé principalement au niveau de la membrane plasmique [98]. Par ailleurs, le traitement par un FTI inhiberait la localisation de RhoB à la membrane plasmique [237]. La localisation différentielle de RhoB en fonction de la nature de son prényl ainsi que la proportion d'une

forme par rapport à l'autre, pourrait être à l'origine des différences fonctionnelles entre RhoB-F et RhoB-GG.

b. La palmitoylation

Alors que RhoA et RhoC présentent un domaine polybasique dans la région C-terminale, RhoB possède deux résidus cystéine (Cys189 et Cys192), en amont de la cystéine prénylée (Cys193), cibles d'une palmitoylation (addition réversible d'un acide palmitique par thioestérification sur un résidu cystéine) [99, 233]. La palmitoylation de la cystéine 192, au même titre que la prénylation sur la cystéine 193, joue un rôle critique dans la localisation [233, 238] et dans les fonctions cellulaires de la protéine RhoB [238]. Néanmoins, les mécanismes de régulation de cette modification post-traductionnelle sont, à l'heure actuelle, encore inconnus.

3. Régulation de l'activation de RhoB (liaison GTP/GDP)

La protéine RhoB présente une forte homologie de séquence avec RhoA dans les régions impliquées dans la liaison aux GEF et aux GAP (notamment dans les domaines Switch 1 et 2). Ceci suggère que bon nombre de GEF ou de GAP décrits pour RhoA devraient interagir, au moins *in vitro*, avec la protéine RhoB. Cependant, la pertinence fonctionnelle de ces candidats potentiels pour RhoB reste, dans la majorité des cas, à confirmer *in vivo*.

a. RhoB et GEFs

Seulement deux GEFs ont été pour l'instant impliqués dans l'activation de la GTPase RhoB *in vitro* et *in vivo* : XPLN [239] et Vav2 [240, 241]. XPLN (eXchange found in Platelet, Leukemia and Neuronal tissue ou ARHGEF3) présente *in vitro* une activité de GEF pour RhoA et RhoB, mais pas pour RhoC. De même, la surexpression de XPLN induit l'activation de

RhoA et de RhoB *in vivo*, mais pas celle de RhoC [239]. Vav2, une RhoGEF de la famille Vav, possède une activité GEF sur la GTPase RhoB *in vitro* [241] et *in vivo*, notamment en réponse à l'EGF [240]. La protéine la RhoGEF, Gef10, est capable d'activer RhoA, RhoC et plus préférentiellement RhoB. L'expression de Gef10 dans des cellules NIH3T3 induit la formation de fibres de stress confirmant l'implication des protéines Rho. De plus, des essais de précipitation des Rho liées au GTP ont permis de caractériser Gef10 comme une nouvelle RhoGEF [242].

b. RhoB et GDIs

Alors que la régulation de RhoA par RhoGDI-1 est clairement établie *in vitro* et *in vivo*, sa capacité à réguler l'activité de la protéine RhoB est controversée, notamment sa capacité à extraire RhoB des membranes [125, 243]. De plus, RhoGDI-1 présente une localisation exclusivement cytosolique et RhoB est absent du cytosol. Enfin, la palmitoylation de RhoB pourrait empêcher sa liaison à RhoGDI-1 *in vivo* [99]. RhoGDI-3 (γ), qui peut être membranaire, montre une forte affinité pour RhoB et RhoG et une faible affinité pour RhoA *in vitro*. De plus, il est capable d'inhiber l'échange GTP/GDP de RhoB *in vitro* ainsi que d'extraire spécifiquement la forme de RhoB lié au GTP des membranes cellulaires [122]. Néanmoins, les études fonctionnelles réalisées *in vivo* laissent penser que RhoGDI-3 est effectivement un GDI de RhoG mais pas de RhoB. En effet, la surexpression de RhoGDI-3 n'entraîne pas de délocalisation de RhoB vers l'appareil de Golgi dans les cellules Hela [244].

À ce jour, les GAPs impliquées dans la régulation de RhoB n'ont pas encore été identifiées.

4. Effecteurs de RhoB

La très forte homologie de la protéine RhoB avec RhoA, explique que de nombreux partenaires décrits pour RhoA se sont avérés des effecteurs potentiels de RhoB (p160ROK α , p160ROK β , Dia1, Dia2, PKN, PRK2, Rhotekine, Rophilin, citron, Kinetin, ...), interagissant également spécifiquement avec la forme active de RhoB *in vitro* [245]. Les deux sérine-thréonine kinases PRK1 (PKN) et PRK2 lient RhoB *via* une région N-terminale appelée REM (N-terminal Rho Effector hoMology région). Cette liaison permet leur phosphorylation par la kinase PDK1 [246 , 247 , 248]. PRK1 et PRK2 appartiennent à la famille des PKC [249] [250]. Les fonctions de RhoB *in vivo* impliqueraient ces deux kinases. En effet, la protéine PRK1 est transloquée aux endosomes en présence de RhoB activé [251 , 252] et est impliquée dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur à l'EGF par RhoB [252]. RhoB serait nécessaire au recrutement de PDK1 aux endosomes par PRK1/2 et permettrait la phosphorylation de PRK1/2 par PDK1 [253]. Par ailleurs, des mutants de RhoB (RhoB T37Y, RhoB F39A, RhoB F39V et RhoB Y42C) incapables de lier les effecteurs PRK1 et PRK2, ne sont plus capables d'inhiber la croissance indépendante de l'ancrage de cellules RIE (cellules épithéliales intestinales de rat) transformées par K-Ras [254]. La recherche de partenaires de RhoB par double-hybride a permis de mettre en évidence une interaction spécifique entre RhoB et le facteur de transcription DB1 [101]. DB1 interagit, spécifiquement avec RhoB *in vitro* et préférentiellement avec la forme active de RhoB, liée au GTP. RhoB inhibe l'activation de la transcription induite par DB1, vraisemblablement *via* la séquestration du facteur de transcription [101]. Un autre effecteur spécifique de RhoB, la protéine p76RBE (pour p76 RhoB Effector), a été identifié par criblage différentiel d'une banque d'ADNc préparée à partir de glandes de thyroïdes canines stimulées par la thyrotropine. Cette protéine contient un domaine HR1 et présente une homologie importante avec la Rhophilin. Elle interagit spécifiquement *in vivo* avec la forme active de RhoB et ne reconnaît ni RhoA, ni RhoC.

P76RBE, qui est cytoplasmique dans les cellules Cos, est recrutée aux endosomes quand RhoB actif est surexprimé [255]. Néanmoins, le lien fonctionnel entre RhoB et p76RBE, n'a pas encore été clairement élucidé. Enfin, il a été démontré que RhoB interagit avec un autre de ses effecteurs, mDia2, au niveau des endosomes pour assurer ses fonctions dans le trafic vésiculaire et la dynamique du cytosquelette d'actine [256].

5. Fonctions biologiques et voies de signalisation

a. RhoB et cytosquelette d'actine

Tout comme RhoA, la protéine RhoB est aussi impliquée dans le contrôle de la formation des fibres de stress d'actine. L'expression exogène d'un mutant constitutivement actif de RhoB (RhoBV14) permet la formation de fibres de stress d'actine ainsi que de points focaux d'adhésion dans des cellules NIH-3T3 privées en sérum [257]. RhoB est aussi nécessaire à la réorganisation du cytosquelette d'actine induit par le TGF β -1 dans les fibroblastes murins [225, 258]. De même, l'équipe d'Ishida a montré dans les cellules PC12, que l'inhibition de RhoB par ARNi, inhibait la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le LPA [259]. Enfin, la re-expression de RhoB dans des fibroblastes embryonnaires murins *rhoB*^{-/-} transformés par H-Ras suffit à restaurer la formation de fibres de stress d'actine induite par les FTI [160]. Si la prénylation de RhoB est essentielle à sa fonction sur le cytosquelette d'actine, cette fonction ne semble pas dépendre de la nature du prényl. En effet, un mutant de RhoB exclusivement farnésylable (RhoBV14-CAIM) et le mutant RhoBV14-CLLL, exclusivement géranylgeranylable, présentent la même capacité à induire le réarrangement du cytosquelette d'actine dans les cellules NIH-3T3 privées en sérum [257].

b. RhoB et cycle cellulaire

Selons les travaux de Zalzman, l'expression de RhoB est régulée au cours du cycle cellulaire [100]. L'expression de la protéine est stimulée lors de la transition G1/S et atteint un pic lors de la phase S du cycle. Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont mis en évidence que la forme farnésylée de RhoB est capable de contrer l'arrêt du cycle cellulaire en G1, induit par un inhibiteur de géranylgeranyl transférase (GGTI). Ces résultats suggèrent donc que RhoB participe au contrôle de la phase G1 du cycle cellulaire [257].

c. RhoB et trafic intracellulaire

La localisation spécifique de RhoB au niveau des endosomes précoces et tardifs [92 , 94] a conduit Mellor à étudier l'implication de RhoB dans la régulation du trafic endocytaire. Ils ont montré dans les cellules HeLa que la protéine RhoB participe à la régulation du trafic intracellulaire du récepteur de l'EGF, suite à son internalisation. Cet événement est dépendant de l'activation de RhoB et serait spécifique de RhoB dans ce modèle cellulaire [252], alors que dans les cellules épithéliales polarisées MDCK, cet événement est contrôlé aussi par RhoA [260]. Plusieurs résultats suggèrent que la protéine PRK1 serait un des effecteurs de RhoB impliqués dans le trafic intracellulaire. RhoB permet également la localisation nucléaire d'Akt dans des cellules endothéliales primaires de rétine participant ainsi à leur survie [261]. Cette étude peut être corrélée avec les travaux de Huang et al qui démontrent que RhoB contrôle le turnover de l'oncogène *c-Myc* en permettant une localisation nucléaire de la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK-3), effecteur d'Akt, qui phosphoryle *c-Myc* entraînant sa dégradation [262].

Ainsi, la protéine RhoB semble jouer un rôle important dans l'adressage de protéines de signalisation vers des compartiments cellulaires spécifiques. Elle pourrait, par ce biais, faciliter certaines de ses fonctions cellulaires (apoptose, migration cellulaire...).

d. RhoB, adhérence cellulaire et migration

En plus de son implication dans la régulation du cycle cellulaire et du trafic intracellulaire, RhoB a un rôle dans l'adhérence et la migration des cellules [263]. Une étude récente du laboratoire prouve que la déplétion de RhoB augmente l'invasion et la migration dans des cellules de cellules BEAS-2B (cellules bronchiques) prolifération [264]. L'effet de RhoB sur la migration dans ce modèle passe par l'isoforme 1 d'AKT.

D'autres études conduites au laboratoire ont mis en évidence l'implication des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ dans la réponse aux radiations ionisantes dans les glioblastomes [265 , 266]. En effet ces protéines, qui sont connues pour leur rôle dans l'angiogenèse et l'invasion, contrôlent la radiosensibilité de cellules U87 (de glioblastomes) *via* l'activation de RhoB et ILK. RhoB pourrait donc être une cible pour radiosensibiliser ce type de tumeurs très agressives.

e. RhoB et réponse au stress

RhoB Et réponse au stress génotoxiques

Le gène *rhoB* est un gène de réponse précoce aux stress génotoxiques (UV, agents alkylants,...) [221 , 228 , 267], suggérant fortement que la protéine RhoB puisse jouer un rôle dans les mécanismes cellulaires de réponse aux dommages à l'ADN.

RhoB et chimiotoxiques

Selon Fritz et son équipe, l'expression exogène de RhoB augmente la sensibilité des cellules NIH-3T3 aux agents génotoxiques tels que le méthyl méthanesulfonate (MMS), le N-méthyl-N'-nitro-n-nitrosoguanidine (MMNG), le cisplatine, le treosulfan, ou le peroxyde d'hydrogène. Cet effet sensibilisant se traduit par une augmentation de la mort des cellules par apoptose [159]. RhoB ne semble pas modifier le taux de réparation des lésions de l'ADN induites par le MMS mais induirait plutôt une prolongation du blocage de la réplication [159]. D'après l'étude des principales voies de signalisation impliquées dans la réponse aux agents alkylants, RhoB

inhibe l'activation de NFκB, *via* l'inhibition de la dégradation d'IκBα [230]. En revanche, RhoB ne joue pas sur la régulation de JNK1, de p38 MAP kinase, d'ERK2 ou d'AP-1. RhoB est aussi capable de sensibiliser les cellules NIH-3T3 transformées par H-Ras au 5-FU [267]. Les résultats des travaux conduits au laboratoire suggèrent que seule la forme géranylgeranylée de RhoB est impliquée dans ce phénomène, *via* probablement l'inhibition de NFκB [268].

RhoB, UV, radiations ionisantes et hypoxie

L'expression du gène *rhoB* est également induite par les rayonnements UV [221, 231]. Les travaux de Fritz sur des cellules NIH-3T3 surexprimant la protéine RhoB suggèrent, à l'inverse des résultats obtenus avec les chimiotoxiques, que RhoB joue un rôle dans la résistance des cellules aux UVC [159]. D'après les travaux menés dans notre laboratoire, RhoB protège les kératinocytes humains de l'apoptose induite par les UVB *via* une signalisation dépendante de l'EGFR [222]. Il a été également observé que RhoB est activé par les UVB dans une première phase précoce indépendamment de la signalisation de l'EGFR puis que son expression est augmentée dans une deuxième phase plus tardive dépendante de l'EGFR. Ces travaux suggèrent aussi que l'inhibition de RhoB module les phosphorylations des protéines Akt et GSK-3 en réponse à l'irradiation UVB [222].

La protéine RhoB joue aussi un rôle dans la radiosensibilité cellulaire, néanmoins son rôle pourrait dépendre du type cellulaire [98, 160, 218, 269]. D'une part, selon Prendergast et son équipe, RhoB participe à la sensibilité aux radiations ionisantes des fibroblastes embryonnaires murins co-transformés par l'adénovirus E1A et par l'oncogène *H-ras* (cellules appelées ER). Ainsi les cellules ER *rhoB*^{-/-} sont plus résistantes que les cellules ER *rhob*^{+/-} à l'apoptose induite par les radiations ionisantes. De plus, la réexpression exogène de la protéine RhoB dans ces cellules *rhoB*^{-/-} restaure leur sensibilité aux radiations ionisantes [160]. D'autre part, la petite GTPase RhoB participe à la radiorésistance cellulaire aussi bien dans les cellules NIH-3T3 [98, 218] que dans les cellules de glioblastome humain U87 [270, 271] et HeLa [218]. Ce

rôle est assuré par la forme farnésylée de RhoB dans les cellules NIH-3T3 [98 , 218]. En effet, seul RhoB-F augmente la survie des cellules NIH-3T3 après irradiation et les protège de la mort post-mitotique *via* notamment une prolongation de l'arrêt en G2/M et l'inhibition de la sur-duplication des centrosomes [98]. La protéine RhoB est aussi impliquée dans la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par des agents non génotoxiques, tels que le taxol, qui est un agent inhibiteur de la dynamique des microtubules [160].

f. RhoB et réponse transcriptionnelle

Comme de nombreuses GTPases Rho, la protéine RhoB possède la capacité de moduler certaines réponses transcriptionnelles. L'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoB est ainsi capable d'induire la transcription SRE-dépendante dans les cellules NIH-3T3 en absence de sérum [236]. Comme pour RhoA [272], cette fonction est dépendante de l'activation de la GTPase, mais ne requiert pas la présence du prényl [273]. Pour Prendergast et son équipe, RhoB régule la transcription SRE-dépendante *via* l'activation de l'effecteur PRK dans les cellules NIH-3T3 [254]. La protéine RhoB est aussi impliquée dans la régulation du facteur de transcription NFkB, responsable de la transcription de nombreux gènes contrôlant en particulier l'apoptose. Néanmoins, contrairement à la plupart des GTPases de la famille Rho, qui activent NFkB, RhoB est impliqué dans son inhibition. RhoB inhibe l'activation d'NFkB induite par les UV, les radiations ionisantes et par des agents non génotoxiques tels que le TPA ou le TNF- α [274]. La protéine RhoB affecte également la réponse transcriptionnelle au TGF β et le pouvoir anti-prolifératif de ce dernier [226 , 275]. Adnane et ses collaborateurs ont montré que RhoB inhibe la transcription du récepteur au TGF- α de type II dans les cellules Panc-1 *via* l'inhibition du facteur de transcription AP-1[275]. Il est possible que la perte d'expression de RhoB au cours de la progression tumorale puisse potentialiser les effets du TGF β sur la motilité cellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine RhoB interagit avec le facteur de

transcription DB1, un facteur de transcription ubiquitaire, impliqué notamment dans l'activation du promoteur de l'interleukine-3 [101]. RhoB inhibe l'activation de la transcription induite par DB1, vraisemblablement *via* la séquestration du facteur de transcription [101]. La surexpression de RhoB dans des fibroblastes murins transformés par Ras, induit la transcription de p21^{WAF/CIP1}, suggérant que RhoB participe à l'inhibition de la transition G1/S [276]. Néanmoins, RhoB ne semble avoir aucun effet sur p21^{WAF/CIP1} dans les cellules Rat-1 ou NIH-3T3 non transformées [257, 276]. Au contraire, l'expression de RhoB-F dans les cellules NIH-3T3 inhibe l'expression de p21^{WAF/CIP1} induite par le GGTI-298 (inhibiteur de Génylyl-gényl Transférase) [257]. Le rôle de RhoB dans la régulation transcriptionnelle de p21^{WAF/CIP1} reste donc à éclaircir. La protéine RhoB augmente également la transcription de NOS-2 (nitric oxyde synthase) induite par les cytokines (IL-1 β , TNF- α et INF- γ) [277]. NOS-2 a été impliquée dans l'inhibition de l'invasion et la formation de métastases *in vitro* et *in vivo* [278]. La régulation de NOS-2 par RhoB pourrait donc participer au rôle anti-tumoral de RhoB. La protéine RhoB est aussi, comme RhoA, potentiellement impliquée dans l'activation transcriptionnelle de la protéine COX-2 (cyclooxygénase-2), une protéine impliquée dans l'invasion et la motilité cellulaire [279] ainsi que dans la régulation transcriptionnelle de la preproendothelin-1, précurseur de l'endothelin-1, peptide aux propriétés vasoconstrictrices, dans les cellules endothéliales vasculaires [280].

g. RhoB et oncogénèse

Si l'implication des protéines RhoA et RhoC dans les processus de transformation cellulaire est aujourd'hui clairement établie [164, 177, 204], le rôle exact de RhoB a été l'objet de controverses. En effet, les premiers travaux publiés attribuaient à RhoB un rôle facilitateur de la transformation cellulaire [100, 168, 236], alors que les études récentes lui attribuent un rôle

de gène suppresseur de tumeur et donc inhibiteur de la prolifération tumorale et notamment un rôle apoptotique, dans les cellules tumorales en condition de stress cellulaire.

RhoB et transformation cellulaire

Dans un premier temps, certaines études ont montré un rôle positif de RhoB dans la transformation cellulaire. Un dominant négatif de RhoB (RhoBN19) est notamment capable d'inhiber la formation de foci, induite par l'oncogène H-Ras dans les cellules Rat-1 et NIH-3T3. Inversement, l'expression d'une forme constitutivement active de RhoB (RhoBV14), dans les cellules Rat-1, potentialise l'activité de l'oncogène *H-ras* et confère aux cellules NIH-3T3 certaines caractéristiques des cellules transformées, telles que l'augmentation de la croissance indépendante de l'ancrage ou du sérum [168]. Le rôle de RhoB dans la transformation a été étayé avec l'étude de l'effet anti transformant des inhibiteurs de farnésyltransférase (FTI). Assez rapidement est apparue l'hypothèse selon laquelle l'effet des FTIs passerait par l'inhibition des fonctions de RhoB-F (transformant) au profit d'un gain des fonctions assurées par RhoB-GG (antitransformant) [273, 281]. En effet, le traitement par FTI entraîne la perte de la protéine RhoB sous forme farnésylée mais surtout une augmentation du taux de la protéine géranylgeranylée. Un gain de RhoB-GG est ainsi suffisant pour faciliter un grand nombre des réponses cellulaires induites par les FTI *in vitro* et *in vivo* [254, 276]. La surexpression de RhoB-GG dans des fibroblastes murins (Rat-1) transformés par v-H-Ras entraîne une réversion morphologique accompagnée de l'inhibition de la croissance dépendante et indépendante de l'ancrage ainsi que de la restauration des fibres de stress d'actine [276]. Les effets antinéoplasiques de la forme géranylgeranylée de RhoB ont pu être étendus à d'autres types cellulaires (cellules murines transformées et cellules dérivées de tumeurs humaines) présentant des altérations génétiques diverses (MCF-7 (RasWT et p53WT), MDA-MB-231 (Ki-Ras muté et p53 WT), LoVo (Ki-Ras muté et p53 muté) et DU145 (Ras WT et p53 null) [254, 276]. Il a d'autre part été mis en évidence que RhoB est nécessaire à la réponse apoptotique et

antineoplasique induite par les FTI. Ainsi, dans des fibroblastes embryonnaires murins cotransformés par l'adénovirus E1A et par l'oncogène H-Ras (cellules ER), l'absence de RhoB (cellules ER *rhob*^{-/-}) induit l'inhibition de la restauration des fibres de stress d'actine, l'inhibition de la croissance dépendante de l'ancrage ainsi que l'apoptose liés aux FTI. De façon similaire, l'absence de RhoB compromet aussi l'effet anti tumorale des FTI *in vivo* (xénogreffes sur souris SCID), *via* notamment l'inhibition de la réponse apoptotique [160]. Ainsi, la protéine RhoB aurait un rôle différent dans la transformation cellulaire selon la nature de sa prénylation. Il a été mis en évidence au sein du laboratoire que si un mutant de RhoB exclusivement géranylgeranylable est capable, comme le RhoB sauvage, de réverser le phénotype transformé des cellules NIH-3T3/H-Ras, en revanche, un mutant de RhoB exclusivement farnésylable potentialise la transformation induite par H-Ras dans ces cellules [268]. Ceci confirme l'hypothèse d'un rôle différent de RhoB dans la transformation selon la nature de sa prénylation. Par contre, l'ensemble des études réalisées sur des lignées tumorales humaines suggère que RhoB est un puissant inhibiteur de prolifération tumorale et un inducteur d'apoptose quel que soit son type de prénylation: RhoB-GG, comme RhoB-F, inhibent la croissance indépendante de l'ancrage, la formation de foci, la prolifération tumorale chez la souris et induisent l'apoptose dans les cellules Panc-1 (adénocarcinome pancréatique humain) et A549 (adénocarcinome de pulmonaire humain) [282 , 283]. Les résultats similaires, en terme de foci, obtenus sur d'autres lignées tumorales humaines HeLa (carcinome cervical humain), C-33A (carcinome cervical humain) et Saos-2 (ostéosarcome) [282] qui ne sont pas mutées pour Ras, suggèrent que RhoB inhibe la transformation cellulaire quelque que soit la nature de son prényl et indépendamment du statut de Ras. Le rôle négatif de RhoB dans l'oncogenèse a également été corroboré par des études de délétion du gène *rhob* chez la souris et dans des fibroblastes embryonnaires murins cotransformés par l'adénovirus E1A et par l'oncogène *ras*. Il apparaît que RhoB n'est pas indispensable au développement normal des souris mais que les

souris *rhoB*^{-/-} présentent une susceptibilité accrue au développement de tumeurs chimio-induites [160]. De même, l'injection de cellules ER, décrites précédemment dans ce paragraphe, dans la cavité intra-péritonéale de souris sv129 entraîne la formation de nodules tumoraux, dont le nombre est plus important lorsque les tumeurs sont issues de cellules ER *rhoB*^{-/-} que de cellules ER *rhoB*^{+/+} [160].

RhoB : oncogène ou gène suppresseur de tumeur ?

L'ensemble des données suggère que *rhoB* peut être un gène suppresseur de tumeur. Néanmoins, aucune altération du gène *rhoB* n'a pu être mise en évidence dans les différentes tumeurs humaines analysées [14, 275]. En effet, l'équipe de S. Sebti [275] n'a mis en évidence aucune mutation sur le gène *rhoB* sur un ensemble de 60 patients atteints de cancer de la tête ou du cou, malgré une perte d'expression de la protéine dans ces cancers. Une perte d'expression de RhoB a également été observée dans d'autres types de tumeurs (ORL, glioblastomes, poumons) et lignées cellulaires tumorales [264, 275, 283, 284, 285, 286]. Cette diminution semble, en outre, être inversement proportionnelle au grade de la tumeur : l'expression de la protéine devient indétectable dans les tumeurs devenues invasives et peu différenciées [275, 283, 286] suggérant que la diminution d'expression de RhoB pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale. Si les mécanismes à l'origine de la diminution d'expression de RhoB dans les tumeurs restent encore à élucider, il apparaît néanmoins que son expression serait réprimée, au niveau transcriptionnel, par les histones déacétylases (HDACs) dans certaines lignées tumorales humaines [284]. Les travaux conduits au laboratoire sur le promoteur humain de *rhoB* ont, par ailleurs, permis de mettre en évidence une région polymorphe, région VNTR (répétition de séquences en tandem dont le nombre est variable) correspondant à la répétition d'un motif de 34-pb, absente du promoteur murin, qui possède une activité régulatrice négative de la transcription [287]. Enfin, une étude suggère que l'expression de

RhoB est aussi régulée négativement par certains oncogènes, tels que *ras*, et que cet événement est une étape critique dans le processus de transformation cellulaire conduisant à la malignité [267]. Jiang et Sebt ont ainsi montré que l'expression des oncogènes *H-ras*, *N-ras*, *K-ras*, *EGFR* et *erbB2*, mais pas celle de *v-Src*, inhibe l'activité transcriptionnelle du promoteur de *rhoB* dans les cellules NIH-3T3, ainsi que dans différentes lignées tumorales humaines (A549, Panc-1, C33A). Inversement, l'expression exogène de RhoB inhibe la capacité de ces mêmes oncogènes à transformer les cellules NIH-3T3, mais ne peut néanmoins inhiber la transformation de cellules NIH-3T3 par *v-Src* [267], un résultat cohérent avec des travaux impliquant la protéine RhoB dans l'activation de c-Src [288]. L'oncogène *ras* diminuerait l'expression de RhoB, *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K / AKT [267].

Rôle de RhoB et dans la transformation cellulaire

Les mécanismes moléculaires impliquant RhoB dans la transformation cellulaire restent encore à éclaircir. L'effet de RhoB sur les fibres de stress d'actine ne semble pas être indispensable au pouvoir anti-transformant de RhoB [254]. Un certain nombre de travaux suggèrent que RhoB peut avoir un rôle dans les processus d'adhérence et de motilité cellulaire. L'expression ectopique de RhoB inhibe l'invasion et la migration cellulaire des cellules NIH-3T3/H-Ras et Panc-1. De plus, l'expression de RhoB dans des cellules B16-F10 (cellules de mélanome à fort pouvoir métastatique) inhibe la formation de métastases pulmonaires chez la souris [267]. Cependant, selon d'autres travaux, l'absence de RhoB dans les fibroblastes embryonnaires murins (FEM) *rhoB*^{-/-} transformés par E1A et H-Ras, inhibe au contraire la capacité d'adhérence et d'invasion de ces cellules [160]. Le rôle de RhoB dans les processus d'adhérence et de motilité cellulaire semble complexe et parfois contradictoire. Certains résultats suggèrent fortement qu'AKT soit une cible importante de RhoB dans la réversion de la transformation cellulaire [267, 283, 286, 289]. Il a ainsi été montré que la réversion par RhoB de la transformation des lignées tumorales A549 et Panc-1, s'accompagne de l'inhibition

de la stimulation d'AKT par les facteurs de croissance (EGF ou IGF-1) [283, 290]. De même, la surexpression de RhoB-GG et de RhoB-WT dans les cellules NIH-3T3 transformées par H-Ras, inhibe l'activation d'AKT induite par Ras ou par le sérum, alors que la surexpression de RhoB-F, qui lui n'a aucun effet sur la réversion de la transformation de ces cellules, ne module pas l'activité d'AKT [268]. De plus, l'inhibition d'AKT par RhoB pourrait être impliquée dans les effets pro-apoptotiques et anti-invasifs de RhoB. Elle pourrait ainsi être à l'origine de l'inhibition de NFκB observée dans les cellules, NIH-3T3/H-Ras [268] et A549 [283] surexprimant RhoB, ainsi qu'à l'origine de l'inhibition de la MMP-2, une des métalloprotéases sécrétées par les tumeurs pour dégrader les composants de la matrice extracellulaire au cours de la migration et l'invasion cellulaire [267]. Néanmoins, le mécanisme par lequel RhoB inhibe l'activation d'AKT reste à éclaircir.

Plusieurs arguments suggèrent l'implication de PRK, un effecteur de RhoB. PRK est une kinase impliquée dans la régulation de l'activité de PDK1, elle-même, kinase d'AKT. Prendergast et ses collaborateurs ont décrit que la kinase PRK joue un rôle important dans l'effet anti-prolifératif de RhoB-GG dans les cellules épithéliales RIE/K-Ras. Ainsi différents mutants de RhoB, incapables de lier l'effecteur PRK, ne sont plus capables d'inhiber la croissance indépendante de l'ancrage de cellules RIE/K-Ras [254]. De même, la kinase PRK2 a été impliquée dans l'apoptose des cellules Rat1/H-Ras induite par les FTI [254]. Enfin, selon Mellor et col, le recrutement aux endosomes de PDK1 et de PRK serait dépendant de Rho [251, 253]. L'hypothèse suivante a donc été proposée : le traitement par les FTI conduirait à la diminution de la forme RhoB-F, essentiellement membranaire, avec augmentation de la forme RhoB-GG, endosomale. Ce déséquilibre conduirait à une séquestration de PDK1 par la forme RhoB-GG au niveau des endosomes. PDK1 ne pourrait plus alors activer la protéine AKT, car son activation requiert son recrutement à la membrane plasmique. Néanmoins, cette hypothèse n'explique pas la capacité de RhoB-F à inhiber l'activation d'AKT et à induire l'apoptose dans

les cellules A549 ou Panc-1. Par ailleurs, rien n'exclut que RhoB puisse inhiber l'activité d'AKT *via* la délocalisation de la kinase [220]. En effet, RhoB a été impliqué dans la localisation de la kinase AKT et dans la régulation de son activité dans des cellules endothéliales de rétine [261]. Parallèlement à l'inhibition de l'activité d'AKT, et selon les travaux conduits dans notre laboratoire, la réversion de la transformation par RhoB dans certaines lignées tumorales (A549 et Panc-1 mais pas dans les cellules NIH-3T3 transformées par H-Ras) s'accompagne aussi de l'inhibition de l'activation constitutive d'Erk [283 , 290]. Prendergast et son équipe ont aussi mis en évidence par micro-array un certain nombre de gènes, comme la *cycline B1*, dont l'expression est régulée par RhoB au cours de l'apoptose induite par les FTI [291 , 292]. Enfin, il n'est pas exclu que l'existence d'une compétition entre RhoB et ses homologues RhoA et RhoC vis-à-vis de certains de leurs effecteurs (ex : PRK pour le trafic du récepteur à l'EGF) puisse ainsi conduire à une atténuation des signaux oncogéniques contrôlés par RhoA et RhoC, grâce à la séquestration de certains effecteurs nécessaires à la transformation cellulaire [201, 254].

V. Les Histones Déacétylases (HDACs) et cancers du sein

1. Les HDACs

Les histones déacétylases (HDAC) contrôlent l'acétylation d'histones et de substrats non-histones. Elles jouent un rôle important dans la régulation de nombreuses voies de signalisation incluant la voie activée par les œstrogènes et la progestérone. Les substrats les plus connus des HDACs sont les histones du nucléosome, unité fondamentale de la chromatine. En général, une hyperacétylation des histones est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle alors qu'une hypoacétylation est associée à une répression de l'expression génique. Cependant, des protéines non histones, dont le RE α et plusieurs de ces corégulateurs, ont été identifiées comme substrats des HDACs.

Les HDACs sont divisées en 4 familles : - la classe I : HDAC1, 2 et 3

- la classe II : elle-même divisée en deux classes :

➤ classe IIa : HDAC-4, 5, 7 et 9

➤ classe IIb : HDAC-6 et 10

- la classe III : HDACs appelées aussi les sirtuines

- la classe IV : HDAC11

Les membres des classes I, II et IV sont homologues aux histones déacétylases de la levure Rpd3 et Hda1 et partagent avec elles des homologies de séquence. Ils nécessitent tous du zinc pour être actifs. A l'inverse, les sirtuines sont homologues à la protéine de la levure Sir2 [293, 294].

Classe I : Cette classe possède une expression ubiquitaire. Elle est préférentiellement localisée dans le noyau et possède une forte activité enzymatique envers les substrats histones. Ces HDACs possèdent une structure simple : un domaine déacétylase relativement conservé entre les différents membres de cette classe avec de courtes extensions amino- et carboxy terminales.

Les HDAC1 et 2, qui sont très similaires et retrouvées généralement toutes deux dans les complexes répresseurs tels que NurD, Sin3, ne sont pas exclusivement des HDACs. Elles peuvent également deacétyler des substrats non histoniques comme les récepteurs nucléaires. HDAC-3 est présente dans des complexes tels que N-CoR-SMRT, alors que la présence de HDAC-8 n'a été décrite dans aucun complexe.

Classe IIa : Ces HDACs ont de longues extensions N-terminales avec des sites de liaison bien conservés pour MEF2 (myocyte enhancer factor 2) et la protéine chaperonne 14-3-3. Après phosphorylation par des kinases comme la CaMK (calcium/ calModuline dependant protein Kinase) ou la protéine kinase D (PKD), ces HDACs se lient à 14-3-3 et passent du noyau vers le cytoplasme. Contrairement aux autres HDACs, les membres de cette classe ont une expression restreinte à certains tissus ou organes. HDAC-5 et 9 sont présentes à des taux élevés dans les muscles, le cœur et le cerveau. HDAC-4 est fortement exprimée dans le cerveau et les os et HDAC-7 est présente en grande quantité dans les cellules endothéliales et les thymocytes. La classe IIa peut recruter la classe I des HDACs grâce à leur domaine HDAC C-terminal. Les membres de cette classe fonctionnent comme des adaptateurs de régulateurs transcriptionnels.

Classe IIb : HDAC-6 est la principale HDAC retrouvée exclusivement dans le cytoplasme. HDAC-6 déacétyle directement des protéines du cytosquelette telles que l' α -tubuline ou des protéines transmembranaires telles que le récepteur de l'interféron α . HDAC-6 est différente des autres HDACs car elle possède 2 domaines déacétylase et un domaine C-terminal en forme de doigt de zinc. Il a été montré dans des cellules NIH-3T3, que l'hormone de croissance stimule la transcription médiée par STAT5, *via* la voie de signalisation RhoA/ROCK. Cette transcription est possible grâce à RhoA qui empêche le recrutement d'HDAC6 par p300 [295]. Peu de fonctions par contre sont connues pour l'autre membre de cette classe, HDAC10.

Les sirtuines (classe III des HDACs) : ces HDACs ont besoin de NAD⁺ pour fonctionner. Elles jouent un rôle important dans l'expression génique, l'apoptose, la réponse au stress, la

réparation de l'ADN et la stabilité du génome, montrant que ces protéines sont des régulateurs importants de la croissance cellulaire et de la prolifération [296].

Classe IV : Cette classe est composée uniquement de HDAC11. Elle se retrouve principalement dans le cerveau, le cœur, le rein et les testicules mais peu d'informations sont connues sur cette protéine. Elle est composée d'un domaine déacétylase homologue à ceux des classes I et II et de courtes extensions N et C terminales.

Les classes I et II des HDACs sont sensibles à des « pan-inhibiteurs » tels que la trichostatine A (TSA) alors que la classe III est insensible à ces inhibiteurs.

2. Les inhibiteurs d'HDACs

La découverte d'une corrélation entre la transcription des gènes et l'acétylation des histones en 1964 [297] a été le point de départ du développement de la recherche sur les histones déacétylases. La première enzyme HDAC a été isolée en 1996 [298], la première structure cristallographique d'une HDAC liée à un inhibiteur (TSA et SAHA) a été identifiée en 1999 [299] et le premier HDACi, le SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid) ou Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 2006 pour le traitement des lymphomes cutanés chez les patients en progression ou en rechute de la maladie après deux traitements systémiques. L'efficacité des HDACi a été démontrée *in vitro* et *in vivo* pour de nombreux cancers en affectant le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation et l'angiogenèse. Les HDACi sont maintenant considérés comme une nouvelle classe d'agents anti-cancéreux. Deux classes majeures d'inhibiteurs d'HDACs existent [300]. Tout d'abord, les plus nombreux, les inhibiteurs d'HDACs sélectifs des HDACs dépendantes du zinc. Ces inhibiteurs sont pour la plupart des « pan-inhibiteurs », ils inhibent en effet l'activité de plusieurs HDACs. Ils sont constitués d'une coiffe (CAP) qui interagit avec les acides aminés d'un bras de liaison ou « linker » (entre la coiffe et le domaine ZBG) et d'un

domaine ZBG (Zinc Binding Group) qui capte l'ion zinc. Les inhibiteurs d'HDACs de cette classe sont essentiellement des acides hydroxamiques. Parmi eux, les plus connus sont le SAHA et la TSA [301 , 302].

La seconde classe cible les HDACs dépendantes du NAD⁺ (les sirtuines). Parmi eux, la nicotinamide bloque l'hydrolyse du NAD⁺ et est en cours d'essai [301 , 302].

Des inhibiteurs plus spécifiques existent, notamment pour HDAC-6 (NCT-10a etb). Ces molécules sont en cours d'évaluation *in vitro* [301 , 302].

Ces molécules sont développées dans plusieurs phases I et II d'essais cliniques pour des patients atteints de maladies hématologiques ou de tumeurs solides [301 , 302]. Ils sont utilisés en monothérapie ou en combinaison avec d'autres médicaments anti-cancéreux [303]. Au moins 80 essais sont répertoriés, qui évaluent au moins 11 différents HDACs différents dans des tumeurs solides ou des hémopathies [304].

3. Les inhibiteurs d'HDAC et cancers du sein

a. HDACs et cancers du sein

Nous avons vu que le RE α est acétylé *in vitro* et *in vivo* sur des résidus lysines. Des données suggèrent que l'acétylation du RE α supprime sa sensibilité à l'E₂ [305].

Par ailleurs, il semble que les HDACs peuvent moduler l'expression du RE α . Des interactions entre HDAC1, le RE α [306] et d'autres cofacteurs [307 , 308] ont été démontrés. *In vitro*, plusieurs arguments suggèrent que les HDACs peuvent jouer un rôle important dans le tissu mammaire. Une étude récente montre une réduction marquée de l'acétylation des histones dans l'épithélium normal par rapport au tissu cancéreux [309]. L'expression de HDAC1, HDAC-2 et HDAC-6 est aussi observée à des taux plus faibles dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Des réductions de l'acétylation de l'histone H4 et du niveau de HDAC1 ont également été observées dans des tumeurs RE négatives par rapport aux tumeurs RE positives.

Des études ont mis en évidence l'expression d'HDAC spécifiques dans les cancers du sein. En utilisant une approche de microarray, HDAC-6 a été identifiée comme un gène de réponse aux œstrogènes qui module la migration de cellules tumorales mammaires *in vitro* [310, 311]. HDAC-6 est exprimée dans les cancers du sein mais sa valeur pronostique reste encore controversée [311, 312]. Selon l'équipe de Krusche, les expressions de HDAC1 et 3 corrélaient de manière significative avec l'expression des récepteurs hormonaux et HDAC1 est un marqueur pronostic d'une meilleure survie [313]. L'équipe de Zhang quant à elle, a montré que les patients dont les tumeurs mammaires expriment des taux élevés d'HDAC1, tendent à avoir une maladie de meilleur pronostic sans lien avec le RE α [312].

Toutes ces études soulignent le rôle potentiel de la dérégulation des HDACs dans les cancers du sein. Toutefois, ces données sont concentrées sur peu d'HDACs (essentiellement HDAC1, 3 et 6) ; l'expression des autres familles n'étant pas encore étudiée.

b. Inhibiteurs d'HDAC et modulation de l'expression des RE

Dans des lignées RE α négatives :

La perte de l'expression du RE α est associée avec une insensibilité à l'hormonothérapie chez les patientes atteintes de cancer du sein [314, 315]. Les modifications épigénétiques du RE α telle que la méthylation du promoteur seraient un mécanisme possible de la perte du RE α [18, 316]. La mise en silence du promoteur du RE α dans la lignée cellulaire MDA-MB-231, entraîne une structure condensée de la chromatine (représentatif d'un état transcriptionnel non permissif). La chromatine est alors associée avec des DNMT1, DNMT3b, déméthyltransférases, HDAC1 et présente une méthylation au niveau de la lysine 9 de l'histone H3 (H3-K9) [317]. Le traitement avec un inhibiteur d'ADN méthyltransférase (5-aza-2'deoxyctidine= AZA) cause une déméthylation partielle du RE α sur les îlots CpG et restaure l'expression d'un RE α fonctionnel dans des lignées de cancer du sein RE α négatives [318,

319]. A coté de ces inhibiteurs d'ADN méthyltransférase, les HDACi comme la TSA peuvent aussi induire la réexpression du RE α dans des lignées cellulaires RE α négatives [320, 321]. Les mécanismes moléculaires par lesquels les HDACi réactivent le gène *ESR1*, codant le RE α et « mis en silence » dans les MDA-MB-231, incluent la réorganisation de la chromatine : par exemple, la TSA induit l'acétylation des histones H3 et H4 mais réduit l'expression d'HDAC1 et la méthylation d'H3-K9 sur le promoteur du *RE α* [321].

De plus, dans les lignées de cancers du sein RE α négatives, telles que les cellules MDA-MB-231 et MDA-MB-435, un traitement avec l'HDACi LBH589 à 100 nM pendant 24h restaure l'expression du RE α (protéine et ARNm) sans qu'une déméthylation ne soit observée au niveau des îlots CpG du promoteur du RE α [322]. L'expression du RE α est maintenue au moins 96h après le traitement avec le LBH589 [322]. Les mêmes auteurs ont démontré que la restauration de l'expression du RE α par le LBH589 augmente la sensibilité au 4-hydroxy-tamoxifène dans des cellules MDA-MB-231 [322]. Une année plus tard, la même équipe démontre que la réexpression du RE α par le SAHA (autre « pan » inhibiteur de HDAC) est couplée à une perte de l'EGFR dans des cellules MDA-MB-231 qui surexpriment normalement l'EGFR [323]. Cette régulation négative de l'EGFR par le SAHA résulte d'une diminution de la stabilité de son ARNm. Leurs expériences montrent également que cette diminution d'EGFR conduit à l'abolition des voies dépendante de l'EGF comme la phosphorylation de PAK1, P38MAPK et AKT. Ces données sont importantes dans la perspective de l'utilisation de HDACi associé à l'hormonothérapie dans les tumeurs RE α négatives, puisque différentes voies de signalisation peuvent être impliquées dans la résistance au tamoxifène. Hirokawa *et al* ont démontré que l'HDACi FK228 peut bloquer l'activation de PAK1 et peut ainsi éliminer la résistance au tamoxifène dans des cellules MCF-7 [324]. Plus récemment, l'équipe de Fortunati a reporté les effets de l'acide valproïque (VPA), sur l'expression du RE α et son activité dans des cellules MDA-MB-231 [325]. Le VPA est une molécule aux propriétés anti convulsivantes connues

mais également développée plus récemment pour ses effets inhibiteurs d'HDAC. Dans des cellules traitées avec le VPA, une réponse transcriptionnelle correcte à l'œstradiol a été observée après transfection avec un gène codant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant une ERE, ainsi qu'une augmentation de l'expression d'un facteur de transcription lié au RE α , FoxA1, une augmentation de l'expression de gènes régulés par E₂ et enfin un effet inhibiteur du tamoxifène sur la croissance cellulaire. En résumé, le VPA confère aux MDA-MB-231 un phénotype de sensibilité aux œstrogènes, restaurant ainsi la sensibilité de ces cellules à l'hormonothérapie.

Dans des lignées RE α positives :

Contrairement aux cellules RE négatives, le traitement des cellules RE α positives avec un HDACi sélectif ou non, est associé à une répression de l'expression du RE α et des gènes régulés par les œstrogènes [326 , 327 , 328 , 329], à une régulation post-transcriptionnelle du RE α [330 , 331] et une sensibilisation des cellules tumorales au tamoxifène [324]. Cette sensibilisation impliquerait une régulation positive du RE β [332]. Un traitement de ces cellules MCF-7 par des inhibiteurs spécifiques de la classe II des HDACs, les molécules MC1575 et MC1568, entraîne tout comme avec la TSA, un arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de l'expression de l'inhibiteur de cdk, p21^{waf/ras} et du RE β [333]. De plus, et contrairement à la TSA, le MC1575 n'induit pas l'apoptose de ces cellules ni la répression de l'expression du RE α .

Le traitement de cellules MCF-7 avec le SAHA aboutit à une diminution de l'expression du RE α (ARNm et protéine). L'inhibition du protéasome annule l'effet du SAHA sur la protéine RE α mais pas sur les taux d'ARN de celui-ci [329]. L'équipe d'Alao [328] a également observé une réduction des taux d'ARNm du RE α en utilisant un autre « pan-inhibiteur » de HDAC, la TSA.

La protéine chaperonne HSP90, qui se lie au RE α en absence de ligand, exerce sa fonction après déacétylation par les HDACs, en particulier *via* HDAC-6 qui est cytoplasmique [334]. L'inhibition d'HDAC6 amène à une hyperacétylation de Hsp90, diminue son association avec le RE α et finalement à l'ubiquitination du RE α et sa dégradation.

L'ensemble de ces données montre qu'un traitement par des inhibiteurs d'HDACs sur des tumeurs RE positives pourrait avoir un rôle inhibiteur de prolifération par l'inhibition de l'expression du RE α .

HDACis et expression du RE β :

Peu d'études décrivent l'effet de l'inhibition des HDAC sur l'expression du RE β dans les cancers du sein. Les HDACi augmentent l'expression du RE β au moins au niveau transcriptionnel dans les lignées RE α positives et négatives [267 , 335]. Les régulations du RE α et du RE β sous HDACi suivent des cinétiques différentes, suggérant que plusieurs voies de signalisation sont impliquées [333]. Le traitement par des HDACi augmente également l'activité transcriptionnelle du RE β [333]. Selon l'équipe de Jang, l'induction du RE β sous HDACi peut être impliquée dans la sensibilisation des cellules RE négatives à l'hormonothérapie [267].

c. Molécules en cours d'essai clinique dans les cancers du sein

Plusieurs HDACi ont été étudiés dans des phases précoces d'essais cliniques et notamment dans les cancers du sein. Administrés seuls, les HDACis ont une activité limitée sur des patients atteints de tumeurs malignes solides incluant les cancers du sein. Par exemple, une phase II utilisant le Vorinostat® (SAHA) seul, chez des patientes atteintes de cancers du sein métastatiques, a abouti à une stabilisation de la maladie sans réponse objective si bien que l'essai a été arrêté. En se basant sur des études précliniques, l'équipe de Munster, [336] a initié

un essai clinique combinant le Vorinostat et le tamoxifène chez des femmes atteintes d'un cancer du sein métastatique RE positif dont les tumeurs progressent après traitement par anti-aromatases. Les premiers résultats de cet essai montrent une stabilisation de la maladie dans 33% des cas et une réponse objective dans 21% des cas.

Dans les cancers du sein métastatiques, d'autres essais cliniques associant un HDACi comme le Vorinostat® (SAHA), le Panobinostat® (LBH589), l'acide valproïque (VPA) ou l'Entinostat® (SNDX-275) et une chimiothérapie, le trastuzumab ou une hormonothérapie sont en préparation ou en cours. Peu d'études sont publiées à ce jour. Une phase I/II combinant le VPA et une chimiothérapie (Epirubicine/ FEC) a été publiée [336]. Cette étude résume les effets pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du VPA, administré en combinaison avec l'épirubicine et les effets de cette association sur la tumeur et les autres tissus et organes.

En résumé, il existe une littérature significative suggérant l'effet bénéfique d'une association d'un HDACi et d'une hormonothérapie dans les tumeurs RE négatives (ré-expression du RE α restauration d'une hormonosensibilité) et RE positives. Toutefois, une meilleure compréhension des mécanismes d'action de ces inhibiteurs est nécessaire. Nous l'envisagerons dans l'introduction de la troisième partie des résultats.

Les associations d'inhibiteurs de HDAC et d'ADN MéthylTransférase sont à présent proposées pour permettre un effet synergique sur la levée de la barrière épigénétique et donc sur la réexpression du RE α et la restauration d'une sensibilité aux anti-œstrogènes [337 , 338] Cependant, la séquence et la durée d'administration des deux inhibiteurs par rapport au temps d'initiation du traitement anti-œstrogénique sont des paramètres importants à considérer. Il semblerait que l'administration initiale de l'inhibiteur d'ADN MéthylTransférase avant le traitement par TSA et Tamoxifène soit à privilégier [339].

Objectifs de la thèse

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans les cancers du sein. La plupart des cancers du sein expriment les récepteurs hormonaux (RE et RP) et sont donc traités par hormonothérapie. Toutefois, l'apparition de résistances à ces traitements impose la nécessité de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux précédents de l'équipe au sein de l'INSERM U563 montrent l'implication des protéines Rho dans la transcription dépendante du RE α dans des modèles de cancers mammaires. En effet, le traitement de MCF-7 par la toxine C3 transférase de *Clostridium botulium*, qui inhibe l'activité des 3 protéines RhoA, RhoB et RhoC, abolit la transcription dépendante du RE α . En utilisant ce même inhibiteur, il a été montré qu'au moins une de ces protéines Rho a un effet négatif sur la transcription dépendante du RE α [197]. Par ailleurs il a été prouvé que des protéines prénylées modifient l'équilibre des co-régulateurs associés au RE α et en particulier le coactivateur SRC-1 et du corépresseur HDAC1 [196].

L'objectif principal de mon travail a été d'identifier les effets spécifiques de chaque protéine Rho : RhoA, B et C, dans la transcription dépendante du RE α et de déterminer les mécanismes impliqués.

La première partie de ce travail est présentée sous forme de deux manuscrits, l'un soumis et l'autre en préparation. Dans le premier, nous avons étudié l'expression de RhoB dans des tumeurs de patientes traitées ou non au tamoxifène. Puis nous avons pu confirmer et analyser ces résultats sur des modèles cellulaires et animaux. Pour cela, nous avons précisé l'effet de RhoB sur l'expression du RE α ainsi que sur l'expression d'un de ses gènes cibles majeur, le RP.

Le second travail met en évidence et compare les effets de RhoA et RhoC sur le recrutement du RE α sur 3 gènes cibles, la transcription dépendante du RE α et l'expression du RE α .

Enfin, dans une troisième partie, nous avons déterminé l'existence d'un dialogue entre RhoB et le corépresseur HDAC1. Ce travail est également présenté sous forme d'un troisième manuscrit, en préparation.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence un nouveau rôle des protéines Rho dans les modèles de cancers mammaires et notamment de RhoB qui apparaît comme pro-oncogénique dans ces modèles de cancers du sein hormono-dépendants.

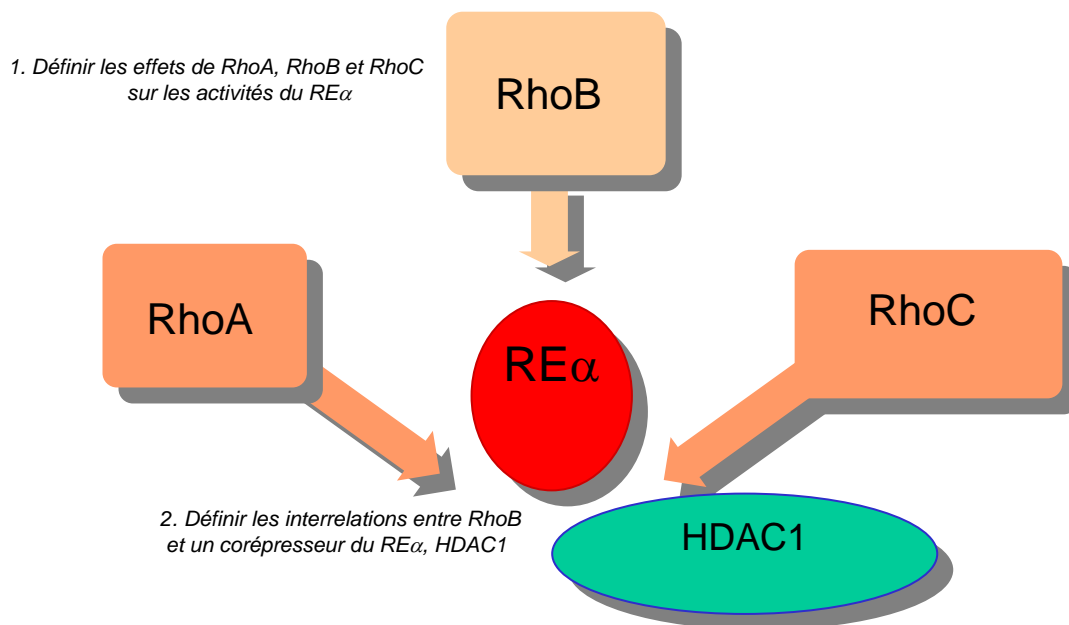


Figure 11 : Objectifs de la thèse

RESULTATS

I. RhoB modifie les réponses aux œstrogènes dans des cellules de cancers du sein en influençant l'expression du récepteur des œstrogènes α .

Introduction

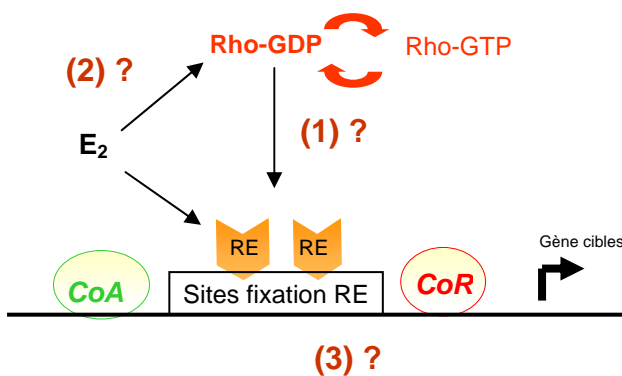
L'hormonothérapie est recommandée dans deux tiers des cas de cancers du sein exprimant les récepteurs hormonaux. Il y a cependant apparition systématique de résistances, primaires ou acquises, à ces traitements [340]. Comme nous l'avons vu précédemment, les effets transcriptionnels du RE α sont contrôlés par des ligands comme l'œstradiol mais également par l'existence d'un dialogue entre le RE α et la voie des facteurs de croissance. Il a été montré que les protéines prénylées telles que les protéines Rho sont des éléments importants de ce dialogue [341 , 342]. De plus, des facteurs de croissance présents dans le microenvironnement peuvent activer les protéines Rho [177] et plus particulièrement RhoB [89 , 223 , 240].

RhoB, sous sa forme active liée au GTP interagit avec ses effecteurs et permet ainsi des processus tels que la transformation néoplasique, la survie, l'invasion et les métastases qui sont des phénomènes importants dans la cancérogenèse [166]. Il est considéré comme un suppresseur de tumeur dans des cellules cancéreuses de différentes origines mais dans les cancers du sein, aucune étude ne le démontre. Toutefois, la surexpression de GEFs a été corrélée au pronostic de cancers du sein [205]. La progression du cancer du sein est accompagnée en effet d'une diminution de l'expression du pro-oncogène Tiam qui est une GEF des protéines Rho. De plus l'expression de RhoGDI α corrèle avec le diagnostic des patientes atteintes de cancer du sein [193]. Parmi ces régulateurs, RhoGDI ou Dbp2 interagissent directement avec le RE α afin de moduler la transcription dépendante du RE α [207].

Nous avons vu que différentes études suggèrent que RhoB est impliqué dans la signalisation du RE α . Toutefois, il n'y a aucune étude détaillant la corrélation exacte entre ce récepteur et RhoB et surtout aucune preuve clinique n'a pu être avancée.

Le but de cette étude était donc de montrer l'implication de RhoB dans les cancers du sein hormonodépendants et de déterminer l'existence d'un dialogue entre RhoB et la signalisation du RE α , en s'appuyant sur l'analyse de tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein et traitées par du tamoxifène ou non. Nous avons réalisé une analyse préliminaire des informations regroupées dans la banque de données Oncomine (www.oncomine.org) qui nous a encouragés à réaliser une étude rétrospective sur ces patientes.

Différents axes étudiés dans cette partie



(1) Effet de RhoB sur le RE α

(2) Effet des œstrogènes sur RhoB

(3) Effet de RhoB sur les activités du RE α :

- expression des gènes cibles
- recrutement

Exemple du récepteur de la progestérone (RP)

RhoB modifies estrogen responses in breast cancer cells by influencing expression of the estrogen receptor.

Elise Meunier^{1,2,3}, Emilie Malissein^{1,2}, Isabelle Lajoie-Mazenc^{1,2,3}, Bettina Couderc^{1,3,4}, Yann Bergé^{1,2}, Thomas Filleron¹, Laura Keller¹, Claudine Marty¹, Georges C. Prendergast⁵, Magali Lacroix-Triki¹, Gilles Favre^{1,2,3}, Florence Dalenc^{1,2}, Sophie F. Doisneau-Sixou^{1,2,3}

¹- Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31300, France

²- INSERM U563, Toulouse, F-31300, France

³- Université de Toulouse, Toulouse, F-31300, France

⁴- EA3035, Toulouse, F-31300, France

⁵- Lankenau Institute for Medical Research, Wynnewood, PA, USA

Acknowledgements

This work was supported by the INCa, GSO, foundation RITC (C. Silvagni), INSERM, Institut Claudius Regaud and University of Toulouse. E. Meunier had a Ph.D. fellowship from the MRES.

Corresponding author

Gilles Favre

Institut Claudius Regaud, 20-24 rue du pont St Pierre, 31052 Toulouse France

Tel+33 561 424 223

Fax+33 561 424 631

favre.gilles@claudiusregaud.fr

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to disclose regarding this work.

Running head

RhoB modifies estrogen responses in breast cancer

Key words

RhoB/Estrogen receptor/Progesterone receptor/breast cancer

Abstract

RhoB has been reported to exert positive and negative effects on cancer pathophysiology but an understanding of its role in human cancers including breast cancer remains incomplete. Analysis of integrated data assembled in the Oncomine database showed a correlation between *RhoB* expression and positivity for both Estrogen Receptor alpha (ER α) and Progesterone Receptor (PR). This finding was validated by immunohistochemical analysis of a tissue microarray constructed from a cohort of 113 patients. We found that RhoB expression was strongly correlated with ER α and PR expression and inversely correlated with tumor grade, histological tumor size and number of mitosis. In human breast cancer cell lines, RhoB attenuation was associated with reduced expression of both ER α and PR, an observation confirmed for ER α in RhoB-deficient mice, whereas elevation of RhoB was found to be associated with ER and PR overexpressions. Mechanistic investigations suggested that RhoB stimulated the expression of ER α partly by increasing its translation and the expression of PR by accentuating the recruitment of ER α and other major co-regulators to the promoter of the *PR* gene. A major consequence of RhoB modulation was that RhoB differentially regulated the proliferation of breast cancer cell lines. Interestingly, we documented cross-talk between RhoB and ER α , with the loss of ER α decreasing RhoB expression and estrogen treatment leading to RhoB activation. Our findings offer evidence that in human breast cancer RhoB acts as a positive function by promoting expression of ER α and PR in a manner correlated with cell proliferation.

Introduction

Hormone therapy is recommended in approximately two thirds of the cases of breast cancer which express the Estrogen Receptor (ER) alpha and/or Progesterone Receptor (PR). While this therapy is largely effective there are nevertheless many cases of systemic resistance to the treatment. A number of studies have addressed the question of the mechanisms of resistance to hormone therapy (1). ER α transcriptional effects are not only determined by ligands as estradiol, but also by crosstalk between ER α and growth factor signaling (2). In some cell contexts, ER α interacts directly with c-Src and other cytoplasmic signaling and adaptor molecules. The hierarchy among these associations is not known and other growth factor receptors are likely to be required (2).

Prenylated proteins such as Rho small GTPases are key elements in cross-talk and integration of growth factor signal transduction pathways. Indeed, a variety of growth factors present in the tumor microenvironment activate Rho proteins (3), especially RhoB (4) (5) (6). Like other Rho family proteins, RhoB cycles between GTP- (active) and GDP (inactive)-bound states, forming interactions with a variety of regulators and effectors that modulate activity and influence important processes in cancer, including neoplastic transformation, survival, invasion, and metastasis (7). RhoB, in contrast to its relatives RhoA and RhoC, has been shown to play a negative role in oncogenesis in mice, where it has been shown to function as a tumor suppressor gene on the basis of investigations of genetically RhoB-deficient strains (8) and in human cancer cells (9) (10). RhoB has a short half-life (11) and is an immediate early response gene that is induced by a variety of stimuli, including growth factors (4) (12) (13) (14), hypoxia (15), or DNA-damaging agents (16) (17). Although no constitutively active mutants of Rho GTPases have been detected in human tumors, a correlation has been demonstrated between Rho protein overexpression and poor clinical outcome in breast cancers (reviewed in (18)). Specific RhoB overexpression has been correlated to disease progression (19) but this correlation is controversial

(20). However, specific overexpression of Guanine Exchange Factors (GEF) for Rho GTPases also have been correlated to prognosis in breast cancers (21). Indeed, breast tumor progression is accompanied by a decrease in expression of the pro-oncogenic RhoGEF Tiam1 (22). Moreover, expression of Rho GDP dissociation inhibitor α (Rho-GDI α), a negative regulator of Rho proteins, is reported to correlate with the outcome of patients with breast cancer treated by adjuvant chemotherapy (23). From a molecular point of view, scaffold proteins involved in Rho functions, such as Rho-GDI or DbpA, have been observed as part of ER α -containing complexes (24) (25) where direct interaction between ER α and Rho-GDI has been demonstrated (26).

While some studies have suggested a specific involvement of RhoB in ER signaling, there have not been any detailed investigations in breast cancer cells, including to assess correlations with expression of hormone receptors in tumors. Thus, an important goal of the present study was to determine the involvement of RhoB in hormone-dependent breast cancers and to investigate hypothesized cross-talks between RhoB and ER α signaling.

Materials and Methods

Construction and immunohistochemical analysis of TMA

A tissue microarray (TMA) was constructed from a cohort of 215 patients described in Supplemental data. 600- μ m diameter cores of histologically confirmed invasive breast carcinomas were extracted from the original paraffin blocks and re-embedded into a gridded recipient paraffin block using a Beecher Inc. tissue arrayer (Alphelys). For each case, 3 tumor cores and 1 normal breast core were taken from the original block.

TMA immunostaining was performed on a Techmate HorizonTM slide processor (*Dako*). Sections were incubated with primary antibodies to ER α (NCL-L-ER-6F11, *Novocastra*), PR (PgR636 clone, *Dako*) and RhoB (sc-180, *Santa Cruz Biotechnology*). ER α and PR status were classified by IHC expression as positive ($\geq 10\%$ immunoreactive cells) or negative ($< 10\%$). RhoB immunostaining was analyzed by evaluation of the percentage of tumor-stained cells and staining intensity, allowing assessment of an ImmunoReactive Score (IRS = % score x intensity score). Correlation of RhoB expression with clinical variables was assessed using Mann-Whitney and Spearman's rank tests. Univariate survival analysis was performed for disease free survival (DFS) by applying the log-rank test to RhoB expression levels stratified by median value.

Cell culture and reagents

The human breast adenocarcinoma cell lines MCF-7, ZR75, T47D, SK-BR-3 and MDA-MB-231 were obtained from the ATCC. Cells were grown routinely in DMEM, (*Lonza*), supplemented with 5% fetal bovin serum (FBS, *Pan*). Hormonoresistant cells, LCC2 (kindly provided by R. Clarke, the Karmanos Cancer Center being the provider of the parent MCF-7 cell line) were grown in F-12 (*Lonza*) phenol red-free medium, containing 5% dextran-coated charcoal-treated (DCC)-FBS. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were grown in DMEM with 10% FBS.

When indicated, cells were deprived of E₂ by growing them in phenol red-free medium containing 5% DCC-FBS. Cells were treated with 50 nM E₂ or 50 ng/mL EGF (*Sigma*), as indicated.

SiRNA transfection

Transient transfection of 40 nM siRNA was performed using Oligofectamine[®] according to the manufacturer's instructions. The siRNA sequences of the oligonucleotide duplexes (*Eurogentec*) were siB1 (5'-CCGUCUUCGAGAACUAUGU-dTdT-3') and siB2 (3'-UGAUAUCCCUUGUCUGUAA-dTdT-3'), siER (5'-GGGAGAAUGUUGAAACACA-dTdT-3'), and the non-specific sequence siControl (siC), (5'-GACGUGGGACUGAAGGGGU-dTdT-3').

Adenoviral constructs expressing RhoB and transduction protocol

Replication-defective (deltaE1, E3) adenoviral (Ad) vectors expressing RhoB under the transcriptional control of the CMV promoter were constructed with the Adeasy System (*Qbiogen*) as described previously (27). Cells were plated 24h prior to transduction with adenoviral vectors (control empty vector, AdC, or expressing RhoB, AdB) at a multiplicity of infection (MOI) of 100:1.

Western Blot analysis of human cell lines

Cells were lysed and protein analyzed by SDS-PAGE as already described (15). Antibodies were used against RhoB (sc-180), ER α (sc-543) from *Santa Cruz Biotechnology*, phospho-estrogen receptor α (Ser¹¹⁸, 2511) and (Ser¹⁶⁷, 2514) from *Cell signaling*, PR (PgR636 clone) from *Dako*, β actin (MAB1501) from *Chemicon*, and the secondary antibodies were antimouse (MP21120) and antirabbit (MP23145) horseradish peroxidase from *Interchim*. Protein abundance was quantified by densitometric phosphoimager analysis (*GE healthcare*).

Quantitative Reverse Transcribed PCR (qRT-PCR) of human cell lines

Total RNA was isolated 16h after stimulation by E₂, using RNeasy kit according to the manufacturer's instructions (*Qiagen*), then reverse-transcribed using iScript™cDNA Synthesis Kit (*Biorad*). Quantitative PCR was performed with an iQreal-time PCR detection system (*Biorad*) using iQ™ SYBR® Green Supermix (*Biorad*). The primer pairs used were: for GAPDH, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; for 28s 5'-TCGCTGGGTCTTGGATGTC-3' and 5'-AGCAGATTGTGACAGACCATTCC-3'; for PR 5'-CGCGCTCTACCCTGCACTC-3' and 5'-TGAATCCGGCCTCAGGTAGTT-3' (*Eurogentec*).

Analysis of MEF generated and uteri collected from RhoB -/- mice

Homozygous (-/-) and heterozygous (+/-) mutant strains of RhoB-deficient mice (8) were housed in polycarbonate cages in a room with controlled conditions. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were generated and grown in cell culture facilities (8), and then lysed (15). 6 week-old mice uteri were collected and lysed in Bunone buffer (28). Protein were extracted and analyzed as described above with antibody against murine ER α (sc-542, *Santa Cruz Biotechnology*).

GST pull-down assay

The level of activated RhoB, GTP-bound RhoB protein was measured using the GST fusion protein containing the Rho binding domain of the downstream effector Rhotekin and adapted to RhoB (6). The amount of GTP-bound and the total amount of RhoB in cell lysates were determined by Western blot using polyclonal anti RhoB antibodies (sc-180, *Santa Cruz Biotechnology*) (15).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIp) Assay

ChIp assays were performed with modifications of the procedure of Metivier (29) as described (30). Briefly, 10⁶ cells were synchronized by 3 days of culture in DMEM 5% DCC-FCS and then

treated during 1h with E₂ or ethanol. Antibodies used for the immunoprecipitation were: ER α (sc-543), HDAC1 (sc-6299), polII (sc-899) from *Santa Cruz biotechnology* and Histone H3 acetylated (ab1791) and H4 acetylated (ab193) from *Abcam*.

Quantitative PCR were performed on an iCycler (*Biorad*) using the following primers 5'-GGCGACACAGCAGTGGGGAT-3' and 5'-TCTCCTCCCTCTGCCCCTATATTC-3' (*Eurogentec*) to amplify the fragment of the human PR promoter flanking the + 745 AP-1 DNA binding motif where ER α is known to bind (31).

Cell growth determination and statistical analysis

48h hours after siRNA transfection or transduction, cells were seeded at a density of 1,500 cells per well in 6-well plates in DMEM 5% FBS with ethanol (control) or E₂ (50 nM) and counted daily during the next 4 days with a coulter counter (*Beckman Coulter*). A Kruskal Wallis test was performed and the significance threshold was determined at 0.0125 using Bonferroni correction.

Results

RhoB expression correlates positively with receptor status and negatively with grade in human breast tumors. Using the Oncomine microarray database (www.oncomine.org), a correlation between *RhoB* expression and either ER α or PR positivity was documented in data sets from 19 different breast cancer studies. Moreover, 4 studies showed an inverse correlation between *RhoB* expression and tumor grade. To confirm the clinical relevance of RhoB expression levels in breast cancer oncogenesis and outcome, we compared the expression levels of RhoB in breast carcinomas from a cohort of 113 patients. Results regarding patient characteristics are described in Supplemental Table 1. According to the pathological review and new hormone receptor assessment, 65 tumors were classified as of grade I-II, 74 were ER α positive, and 59 were PR positive. Among these tumors 23 presented a lymphovascular invasion and 39 cases presented with positive lymph nodes (LN positive). After randomization, we determined that age, ER α and PR status, histological grade and type and lymphovascular invasion status were similar in the two groups of patients, whether treated or not. Nonetheless, patients treated with tamoxifen (n=62) had less favorable prognostic factors regarding positive LN, pathological tumor size and number of mitoses.

Figure 1A shows the RhoB immunohistochemistry stainings of 2 representative tumors of patients displaying opposite hormone receptor status (ER α /PR negative and ER α /PR positive), illustrating the direct correlation between RhoB and both ER α and PR expression. Enlargement of the photographs (Figure 1B) illustrates that in the tumor cells of the ER α /PR-negative patient, RhoB

is present and specifically cytoplasmic, although the staining is weak. For the ER α /PR-positive patient, in addition to cytoplasmic staining a strong nuclear staining was also observed.

A first analysis of the results indicated that in tumors, RhoB expression is strongly correlated with the percentage of ER α (Spearman's $\rho= 0.3659$, $p=0.001$) and PR (Spearman's $\rho= 0.2544$, $p=0.0076$) expression, but inversely correlated with histological tumor size (Spearman's $\rho= - 0.2344$, $p=0.0166$) and number of mitoses (Spearman's $\rho= - 0.2009$, $p=0.0362$). We divided the patients with ER α -positive tumors into two groups with either low or high RhoB expression, and in each group, we further divided the patients into groups that did or did not receive tamoxifen. This analysis argued that the level of RhoB expression was not correlated with disease-free survival of patients with ER α positive tumors, regardless of tamoxifen treatment.

RhoB IRS (Immunoreactive Scores as described in Materials and Methods) that integrate both the percentage and intensity of the staining (Figure 1C), were significantly higher in (i) ER α positive tumors (median 10.5 [3-12]) as compared to ER α negative tumors (median 8 [1-12]), (ii) in PR positive tumors (median 9 [3-12]) as compared to PR negative tumors (median 8 [1-12]) and (iii) in patients with tumor grade I-II (median 9 [3-12]) as compared to grade III (median 8 [1-12]). RhoB level of expression was also higher in the smaller tumor size (≤ 2 cm, median 12 [2-12]) as compared to larger tumors (> 2 cm, median 8 [1-12]). RhoB IRS score was not correlated with the presence of lymphovascular invasion ($p=0.26$), neither with the presence of LN invasion ($p= 0.74$).

RhoB regulates ER α and PR expressions in MCF-7 breast cancer cell line

We confirmed the expectation of an effect of RhoB on ER α and PR expression in MCF-7 cells in the presence of E₂, using 2 different siRNA sequences to target RhoB mRNA (siB1 and siB2)

which reduced expression of RhoB at least 75% (Figure 2A, left panel). Under these conditions we observed associated decreases in ER α and PR expression of 60% and 62% for ER α and 82% and 68% for PR (siB1 and siB2 respectively). This result was confirmed using a total of 4 independent siRNA targeting sequences that could attenuate expression RhoB (data not shown).

To rule out the possibility of off-target effects of the siRNA approach, we transduced MCF-7 cells with an adenoviral vector expressing RhoB (Figure 2A, right panel). The observed two-fold overexpression of RhoB increased expression of both ER α and PR (150% and 160% respectively), further supporting the hypothesized regulatory relationship.

We also studied the levels of ER α phosphorylated forms whose involvement as prognostic markers is discussed below. We observed that the decrease of ER α expression observed when RhoB expression is down-regulated is not associated to any significant specific change of P-Ser¹¹⁸ or P-Ser¹⁶⁷ ER α level (Figure 2B). Indeed, the ratio phosphorylated ER α / total ER α is not modified after RhoB inhibition.

We analyzed further the effect of RhoB down-regulation on ER α and PR expression in the absence and presence of E₂. As expected, E₂ treatment induced a 75% decrease of ER α expression and concomitantly a 20 to 30 % decrease of RhoB expression. In the presence of siB2, a 64% decrease of ER α expression was observed even in the absence of E₂, compared to 86 % in the presence of E₂. The comparison of siB2 to the control expression of ER α in the presence of E₂ shows a 44% decrease (Figure 2C). Regarding PR, in the presence of siB2, a 52% decrease of its expression was observed in the absence of E₂, and a 40% decrease in the presence of E₂. Using immunocytochemistry, we confirmed these results suggesting that RhoB regulates ER α and PR expression both in the presence and absence of E₂, with no dramatic changes of their subcellular localization within MCF-7 cells (Supplemental Figure 1).

RhoB controls ER α expression in breast cancer cell lines and in mice

We extended the study of RhoB down-regulation on ER α expression to additional cell lines (Figure 3A). We confirmed a decrease of ER α expression with RhoB depletion using the two independent siRNA sequences siB1 and siB2 in T47D and ZR75 cells (hormone-dependent cells) and in LCC2 cells (hormone-resistant cells).

We also confirmed the involvement of RhoB on ER α expression *in vivo* using mice that are genetically deficient in RhoB (Figure 3B). A major decrease of ER α expression was visualized in mouse embryo fibroblasts (MEFs) collected from RhoB^{+/-} mice with an even more dramatic decrease in MEFs collected from RhoB^{-/-} mice. In the uterus, a similar effect of RhoB down-regulation was observed with an undetectable level of ER α expression in RhoB^{-/-} mice. We confirmed in uteri a parallel decrease in RhoB and ER α mRNA expression (Supplemental Figure 2). Together these results extended the support for a hypothesized regulatory relationship between RhoB and ER α .

Estrogen induces RhoB activation and expression in MCF-7 cell line

In examining the effect of estrogen on RhoB expression and activity, we found that siRNA-mediated down-regulation of ER α expression (74% by this approach) produced a 22% decrease in RhoB expression (Figure 4A). Given that the activation of RhoB is important for its physiological effect (6) (17) (15), we also investigated the role of estrogen stimulation on the RhoB guanine nucleotide binding status using a traditional small GTPase pull-down assay (Figure 4B), as a strategy to examine rapid effects of E₂ stimulation on RhoB activation as well as expression. We observed that RhoB is quickly activated at 30 min without any change of total RhoB expression at this time point, similar to the effect produced by EGF stimulation described previously (6) (17). At 1h and 2h of treatment, E₂ rapidly increased total RhoB expression with a second peak of GTP-

bound RhoB occurring at 2h that was associated with the parallel increase of total RhoB expression. Together these results suggested that RhoB and estrogen signaling were integrated into a feed-forward loop that may positively modify the biological effects of estrogen treatment.

RhoB promotes ER α transcriptional activation function induced by estrogen

We hypothesized that the ability of RhoB to modulate ER α expression could control the major transcriptional functions of ER α . To examine this hypothesis, we used MELN cells that express luciferase in an estrogen-dependent manner. After siB1 or siB2 transfection and E₂ deprivation, cells were left untreated or treated with E₂ and at later times luciferase activity was quantified (Supplemental Figure 3A). In the absence of E₂ (upper right corner), the transfection of cells by both siB1 and siB2 induced a significant decrease of the luciferase activity (0.5 ± 0.3 fold for B1 and 0.3 ± 0.2 fold for B2). In the control cells, E₂ treatment led to a 9 ± 2.62 fold induction of the luciferase activity. In the presence of E₂, luciferase expression was significantly decreased for cells treated by the siB1 and siB2 sequences (respectively 3.12 ± 1.32 and 4.07 ± 1.04 AU compared to 9 ± 2.62 AU). Nonetheless, E₂ induction was still observed for all cells transfected by either siB1 or siB2.

We extended the analysis of RhoB inhibition on two known estrogen regulated genes, *ER α* and *PR*, using qRT-PCR. We first confirmed (in Supplemental Figure 3B) the expected decrease of ER α mRNA expression in the control cells treated by E₂ alone (to 0.49 ± 0.1). In the cells treated with siB2, a dramatic decrease of ER α mRNA was observed in the absence of E₂ (from 1 to 0.53 ± 0.01) and much lighter in the presence of E₂ (from 0.49 to 0.37 ± 0.11).

Regarding *PR*, a major target gene of ER α , PR mRNA expression was induced in the presence of E₂ (7.7 ± 1.1 fold) in the siRNA control cells (Figure 5A). In cells treated with siB1, there was a significant decrease of PR mRNA levels as compared to their respective control, both without and

with E₂ (respectively 0.5 ± 0.2 and 0.6 ± 0.4 rates). Consequently, E₂ induction was maintained for cells transfected by both siRNA control and siB1 (respectively 7.7 ± 1.1 fold and 9 ± 0.6 fold).

As cells treated with siB2 exhibit very low levels of ER α protein and mRNA in both the absence and presence of E₂ (Figure 2C and Supplemental Figure 3A), it cannot explain RhoB effects on PR expression, that have to be supported by a different mechanism. We used ChIP analysis to study the effect of RhoB inhibition on the recruitment of ER α , ER transcriptional co-factors and RNA polymerase II onto *PR* gene promoter at early times, *i.e.* at 1h after E₂ stimulation (Figure 5B). Following siB1 transfection, the recruitment of RNA polymerase II to the *PR* gene promoter dramatically decreased (rate 0.3 ± 0.2 compared to siC). Recruitment of acetylated H3 and H4 histones were also clearly decreased by RhoB down-regulation (rate 0.36 ± 0.11 and 0.33 ± 0.11 , respectively). Moreover, RhoB down-regulation induced a significant decrease in the recruitment of ER to the *PR* gene promoter (0.52 ± 0.08 rate) paralleled by an increased in recruitment of the ER α co-repressor HDAC1 (1.67 ± 0.35 rate). Together, these results argued that RhoB supported to some extent ER α transcriptional activation function by interfering with its cofactor recruitment.

RhoB induces proliferation in ER positive but not in ER negative breast cancer cell lines

The effect of RhoB on cell proliferation was evaluated in 3 cell lines exhibiting variable levels of expression of ER α and PR, including MCF-7 (ER/PR positive), SK-BR-3 (ER/PR negative and p185^{erbB2} overexpressed) and MDA-MB-231 (“triple negative”). As shown in Figure 6A and B, RhoB positively regulated the proliferation of MCF-7 cells both in the absence or presence of E₂. siRNA-mediated inhibition of RhoB expression produced a 30-35% decrease in MCF-7 cell proliferation as soon as 1 day after transfection with a 40-46% decrease by day 4 (Figure 6A). Conversely, a significant increase in cell proliferation was observed in MCF-7 cells transduced with an adenoviral vector expressing RhoB (Figure 6B), with an increase of 15-28% in relative

cell proliferation at day 1 that reached 22-49% by day 4. In contrast to these observations, under similar conditions infection of SK-BR-3 or MDA-MB-231 cells with the adenoviral RhoB vector either slightly decreased or had no significant biological effect on cell proliferation (Figure 6C and D). The same effects of diminishing or elevating RhoB were seen in each cell line in either the presence or absence of E₂ (Figure 6 and data not shown). We concluded that RhoB had stimulatory effects on proliferation that paralleled its effects on hormone receptor expression.

Discussion

Although the tumor suppressor function of RhoB has been documented in many human cancers (9, 10), RhoB overexpression was suggested to be associated with tumor progression in breast cancers. Using cellular, molecular and human breast tumor analytical approaches, we have shown a positive cross-talk between RhoB and ER α expressions and the critical role of RhoB in the regulation of the proliferation of breast cancer cells expressing ER α .

Our data bring together three lines of evidence to support the cross-talk between ER α and RhoB. Firstly, in human breast cancer tissues we clearly showed a strong correlation between RhoB expression and the expression of ER α and PR. Moreover RhoB expression was associated with a low tumor grade and size suggesting that RhoB is a marker of a good prognosis of the disease. The second strand of evidence came from cellular results showing that the level of RhoB controls the expression of ER α in ER α positive breast cancer cell lines in the presence or absence of E₂. The phosphorylation of Ser¹⁶⁷ has been related in tumors to a longer disease-free period and overall survival whereas the phosphorylation of Ser¹¹⁸ was already known to be a good prognostic marker (32, 33). We found a dramatically decreased level of ER α phosphorylation at both the serine sites that can be attributed to the major decrease in total ER α expression as no significant change in the ratio of the phosphorylated to total ER α was induced by RhoB down-regulation. Besides we also demonstrated that ER α controls the activation and expression of RhoB. Indeed, E₂ treatment induces an increase of the active GTP bound form of RhoB within 30 minutes, without any change in RhoB expression at that time.

Thirdly, we clearly demonstrated *in vivo* the RhoB control of ER α expression in uterus and in MEF cells, from a RhoB^{-/-} mouse model. This regulation is of interest in the context of the epithelial-

stromal interactions, particularly as breast adipose fibroblasts determine the expression level of aromatase (34).

ER α upregulates or down-regulates the transcription of hundreds of genes (35) and *PR* is a well-known ER α target gene. PR expression is systematically assessed in breast cancer tumors because of its major physiological role in cell proliferation. Both PR mRNA and protein expressions were significantly decreased as a consequence of RhoB down-regulation. It was evidenced a clear decrease of the recruitment of RNA polymerase II, acetylated H3 and H4 histones and ER α itself on *PR* promoter gene. In parallel, we described the recruitment of the major transcription co-repressor HDAC1, already known to repress RhoB expression (36). This is the first demonstration of the regulatory role of RhoB in the balance of the associated co-regulators to ER α to control transcription of target genes. The mechanism of this effect is far from being elucidated, but a direct interaction of RhoB with the ER α dependant transcriptional machinery should not be excluded since a direct interaction between ER α and RhoGDI α in breast cancer cells has been demonstrated (26) and we have shown here a strong nuclear localization of RhoB in ER α positive tumor tissues.

In contrast to other cancer models, RhoB is critical for the proliferation of ER α expressing breast cancer cells, suggesting that RhoB acts as a positive regulator in this model. Inversely, in the ER α negative cell line SK-BR-3 and in the MDA-MB-231 triple negative cell line model, RhoB has no effect on cell proliferation thus reinforcing the idea that RhoB promotes cell proliferation through ER α expression. Moreover, these results suggest that RhoB down-regulation in breast cancer cells could be associated to tumor progression in parallel to ER α extinction. The chronology of these two molecular events remains to be elucidated.

In conclusion, RhoB appears to be a key inducer of ER α and a key regulator of PR expressions, through various complex mechanisms underlying a feed-forward loop that may control estrogen effects, including cell proliferation. Finally, our new findings shed light on the role of RhoB in tumorigenesis involving a dual effect depending on the cellular context with a potential pro-oncogenic function in hormone dependant breast cancer cells.

References

1. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 631-43.
2. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA. Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009; 74: 622-7.
3. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 2002; 84: 57-80.
4. Jahner D, Hunter T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 3682-90.
5. de Cremoux P, Gauville C, Closson V, et al. EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1994; 59: 408-15.
6. Gampel A, Mellor H. Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* 2002; 366: 393-8.
7. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796: 91-8.
8. Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 6906-12.
9. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Munoz-Antonia T. Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2225-32.
10. Mazieres J, Antonia T, Daste G, et al. Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2742-50.
11. Lebowitz PF, Davide JP, Prendergast GC. Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 6613-22.
12. Zalcman G, Closson V, Linares-Cruz G, et al. Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* 1995; 10: 1935-45.
13. Gampel A, Parker PJ, Mellor H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* 1999; 9: 955-8.
14. Engel ME, Datta PK, Moses HL. RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 9921-6.

15. Skuli N, Monferran S, Delmas C, et al. Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 482-9.
16. Fritz G, Kaina B, Aktories K. The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediately inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 1995; 270: 25172-7.
17. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, et al. RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 43257-63.
18. Tang Y, Olufemi L, Wang MT, Nie D. Role of Rho GTPases in breast cancer. *Front Biosci* 2008; 13: 759-76.
19. Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 2002; 87: 635-44.
20. Jiang WG, Watkins G, Lane J, et al. Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6432-40.
21. Lane J, Martin TA, Mansel RE, Jiang WG. The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2008; 5: 23.
22. Stebel A, Brchetti C, Kunkel M, Schmidt M, Fritz G. Progression of breast tumors is accompanied by a decrease in expression of the Rho guanine exchange factor Tiam1. *Oncol Rep* 2009; 21: 217-22.
23. Ronneburg H, Span PN, Kantelhardt E, et al. Rho GDP dissociation inhibitor alpha expression correlates with the outcome of CMF treatment in invasive ductal breast cancer. *Int J Oncol*; 36: 379-86.
24. Rubino D, Driggers P, Arbit D, et al. Characterization of Brx, a novel Dbl family member that modulates estrogen receptor action. *Oncogene* 1998; 16: 2513-26.
25. Su LF, Knoblauch R, Garabedian MJ. Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response. *J Biol Chem* 2001; 276: 3231-7.
26. El Marzouk S, Schultz-Norton JR, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM. Rho GDP dissociation inhibitor alpha interacts with estrogen receptor alpha and influences estrogen responsiveness. *J Mol Endocrinol* 2007; 39: 249-59.
27. Couderc B, Pradines A, Rafii A, et al. In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther* 2008; 15: 456-64.

28. Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, et al. The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 2053-8.
29. Metivier R, Penot G, Hubner MR, et al. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 2003; 115: 751-63.
30. Baron S, Escande A, Alberola G, Bystricky K, Balaguer P, Richard-Foy H. Estrogen receptor alpha and the activating protein-1 complex cooperate during insulin-like growth factor-I-induced transcriptional activation of the pS2/TFF1 gene. *J Biol Chem* 2007; 282: 11732-41.
31. Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, Nardulli AM. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 88: 113-22.
32. Jiang J, Sarwar N, Peston D, et al. Phosphorylation of estrogen receptor-alpha at Ser167 is indicative of longer disease-free and overall survival in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5769-76.
33. Murphy LC, Niu Y, Snell L, Watson P. Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5902-6.
34. Bulun SE, Lin Z, Zhao H, et al. Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1155: 121-31.
35. Carroll JS, Meyer CA, Song J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 2006; 38: 1289-97.
36. Wang S, Yan-Neale Y, Fischer D, et al. Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene* 2003; 22: 6204-13.

Legends to figures

Figure 1: Correlation between RhoB, ER α and PR expressions in tumor samples of breast cancer patients

A: Immunohistochemistry stainings are shown for two patients, representative of both the ER/PR negative and positive populations (magnification x200).

B: Enlargement of the squares represented in A (RhoB staining).

C: Medians of RhoB IRS scores are shown according to ER α and PR positivity, tumor histological grade and tumor size.

Figure 2: Regulation of ER α and PR expressions by RhoB in MCF-7 cells

A: In the left panel, cells were transfected with siC, siB1 or siB2. In the right panel, cells were transduced with adenoviral vectors (MOI of 100:1). 48h later, protein expressions were analyzed.

B: Cells were transfected with siC or siB2. 48h later, protein expressions were analyzed.

C: Cells were transfected with siC or siB2 and three days later, deprived of E₂ for 3 additional days and treated for 16h with E₂ or ethanol. Protein expressions were then analyzed.

All results are representative of 3 independent experiments.

Figure 3: Regulation of ER α expression by RhoB in other breast cancer cell lines and *in vivo*

A: MCF-7, T47D, ZR75 and LCC2 cells were transfected with siC, siB1 or siB2. 48h later, protein expressions were analyzed.

B: Protein expressions were determined on Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) and on uteri of RhoB-deficient mice.

All results are representative of 2 to 3 independent experiments.

Figure 4: Regulation of RhoB expression by ER α down-regulation and activation of RhoB by E₂ in MCF-7 cells

A: Cells were transfected with siC or siER. 48h later, protein expressions were analyzed.

B: Cells were deprived of E₂ for 3 days and then treated by E₂ or EGF during the indicated times. GTP-bound RhoB and total lysates were detected.

Representative of 3 to 4 independent experiments.

Figure 5: Effect of RhoB inhibition on PR mRNA levels and on the recruitment of histones and cofactors on PR promoter

MCF-7 cells were transfected with siC, siB1 or siB2 and 3 days later, deprived of E₂ for 3 additional days.

A: Cells were then treated for 16h with E₂ or ethanol and expression of *PR* gene was measured.

B: Cells were treated for 1h with E₂ and lysed for ChIp experiments using antibodies directed to: ER α , H3 or H4 acetylated histones, HDAC1 or RNA polymerase II. The specificity of the immunoprecipitation was controlled by the use of nonspecific rabbit IgG. The recruitment of these proteins on *PR* promoter was quantified. The fold of induction of the recruitment of the siB1 *versus* siC conditions were calculated.

Error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**), Student's *t* test.

Figure 6: RhoB differentially affects the proliferation of breast cancer cell lines

48h after transfection or transductions, cells were seeded with E₂ or ethanol and counted daily.

Error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments that generated triplicate data each.

A: MCF-7 cells were transfected with siC or siB1.

MCF-7 (B), SK-BR-3 (C) and MDA-MB-231 (D) cells were transduced with adenoviral vectors (MOI of 100:1). Control Western Blot experiments are shown in the presence of E₂.

According to the Kruskal Wallis test, differences were considered statistically significant at $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**), by comparing siB1 or AdB conditions to the related control condition (either in the presence or absence of E₂). The significance threshold was determined at 0.0125 using Bonferroni correction.

Supplemental data

Materials and Methods of Supplemental data

Patient Population

The TMA was constructed from a cohort of 215 patients with operable primary breast carcinoma, treated at Institut Claudius Regaud from 1980 to 1983, and enrolled in a randomized clinical trial for adjuvant tamoxifen *versus* no adjuvant treatment. Patients received radical mastectomy, modified radical mastectomy or breast-conserving surgery. Axillary lymph nodes were routinely dissected at levels I, II and III, and lymph node metastasis was determined based on histological examination. At that time, tumors were considered as ER α positive using a biochemistry determination. For the present study, paraffin blocks of tumor tissue were available for 114 patients. Among these cases, we failed to assess immunochemistry in only 1 tumor specimen, which was therefore excluded. Histological type, Elston and Ellis tumor grade, and presence of lymphovascular invasion were newly assessed for the 113 specimens available for pathological review. Tumor size was defined as the maximum tumor diameter measured on surgical specimens. Follow-up data were available with a median of 249.9 months. Differences between treatment modality were assessed using a Chi-square or Fisher's exact test for qualitative variables and Mann-Whitney for continuous variables.

Immunocytochemistry

For each condition, $5 \cdot 10^5$ cells were seeded onto glass slides dishes and were grown for 3 days in phenol red-free DMEM, containing 5% DCC-FBS. Then, cells were treated with E₂ during 16h, washed in PBS and fixed in RCL2 (37) for 2 min. Staining was performed by a Techmate HorizonTM slide processor as described for Figure 1. The primary antibody used was a monoclonal

anti-ER α antibody (*HC-20, sc-543, Santa Cruz Biotechnology*, dilution 1:50) or an anti-PR antibody (PgR636 clone, *Dako*, dilution 1:50).

The level of ER α and PR staining was determined by use of the Allred scoring system (38), that is the sum (0-8) of the percentage of stained cells (0-5) and the intensity of staining (0-3).

Quantitative Reverse Transcribed PCR (qRT-PCR) of uteri collected from RhoB $-/-$ mice

6 week-old mice uteri were collected and lysed in Bunone buffer (28). Total RNA was extracted and analyzed in “Materials and Methods” with specific murine primers. The following primer pairs were used: 5'-TCATGGAGTCTGCCAAGGA-3' and 5'-AGCCAGAGGCATAGTCATTGC-3' for murine ER α and 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' and 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' for murine GAPDH.

Luciferase assay

Development of stable transfectants of MCF-7 cells (called MELN cells) has been described previously (39). These cells, kindly provided by P. Balaguer (INSERM 540, France), were established by transfecting MCF-7 cells with ERE- β -globin-luc-SV-Neo plasmid and thus express luciferase in an estrogen-dependent manner.

3 days after siRNA transfection, MELN cells were seeded in DMEM-DCC FBS during 3 days. They were then treated with E₂ or ethanol for 16 h. Cells were then lysed in RLB (Reporter Lysis Buffer, *Promega*). The luciferase activity was measured with LAR (Luciferase Assay Reagent, *Promega*) according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was measured to normalize the luciferase activity data.

Quantitative Reverse Transcribed PCR (qRT-PCR) of ER α in human cell lines

qRT-PCR was performed as described in “Materials and Methods”. The primer pair used was for ER α 5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3' and 5'-GGT CTTTTCGTATCCCACCTTTC-3' (Eurogentec).

References of Supplemental data

37. Delfour C, Roger P, Bret C, et al. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *J Mol Diagn* 2006; 8: 157-69.
38. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998; 11: 155-68.
39. Balaguer P, Francois F, Comunale F, et al. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ* 1999; 233: 47-56.

Supplemental Table 1

Clinical characteristics of patients.

Legends to supplemental figure

Supplemental Figure 1: RhoB down-regulation is associated to decreases of ER α and PR expressions with no dramatic change of their intracellular localization in MCF-7 cells

Cells were transfected with siC or siB2. Three days later, cells were deprived of E₂ for 3 additional days and then treated for 16h with E₂ or ethanol. ER α (A) and PR (B) expressions were then analyzed by immunocytochemistry. Allred score are shown in the upper right corner of each photograph. Representative respectively of 4 and 3 independent experiments.

(A) ER α is highly concentrated in the nucleus of the untreated control with a significant staining of the related cytoplasm. In the presence of E₂, the staining intensities of both nuclei and

cytoplasms were clearly decreased with no more detectable staining in the cytoplasm, confirmed by Allred score assessment (percentage x intensity scores). For siB2 treated cells, similar major decrease of the labeling intensity was observed in the cytoplasm and the nucleus, both in the presence and the absence of E₂. In the presence of E₂, Allred score was maintained at a value of 4 because, in spite of the difference from 30 to 20% of stained cells induced by siB2 treatment, the intensity is kept very low in both cases (value of 1).

(B) PR is mainly detected in the nuclei of the untreated control too. Besides, the presence of siB2 again significantly decreases Allred scores both in the absence and presence of E₂.

Supplemental Figure 2: Regulation of ER α mRNA by RhoB in uteri of RhoB-deficient mice

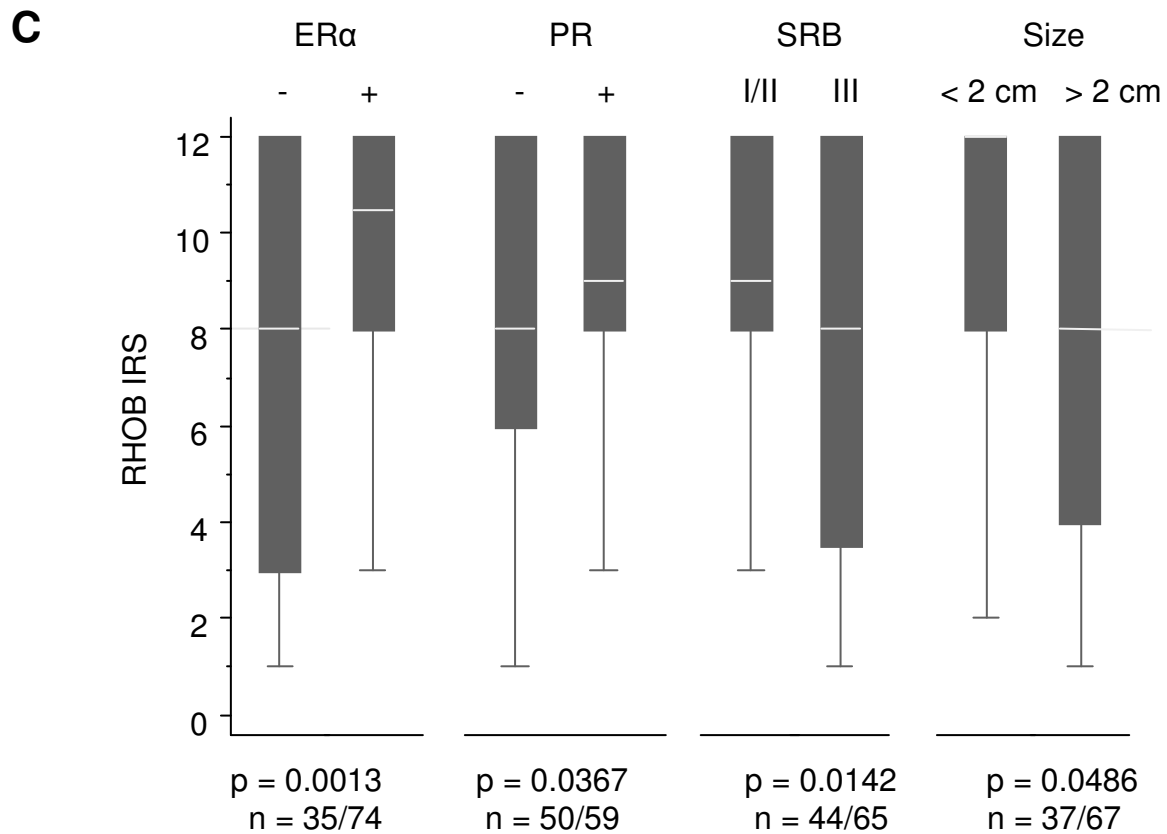
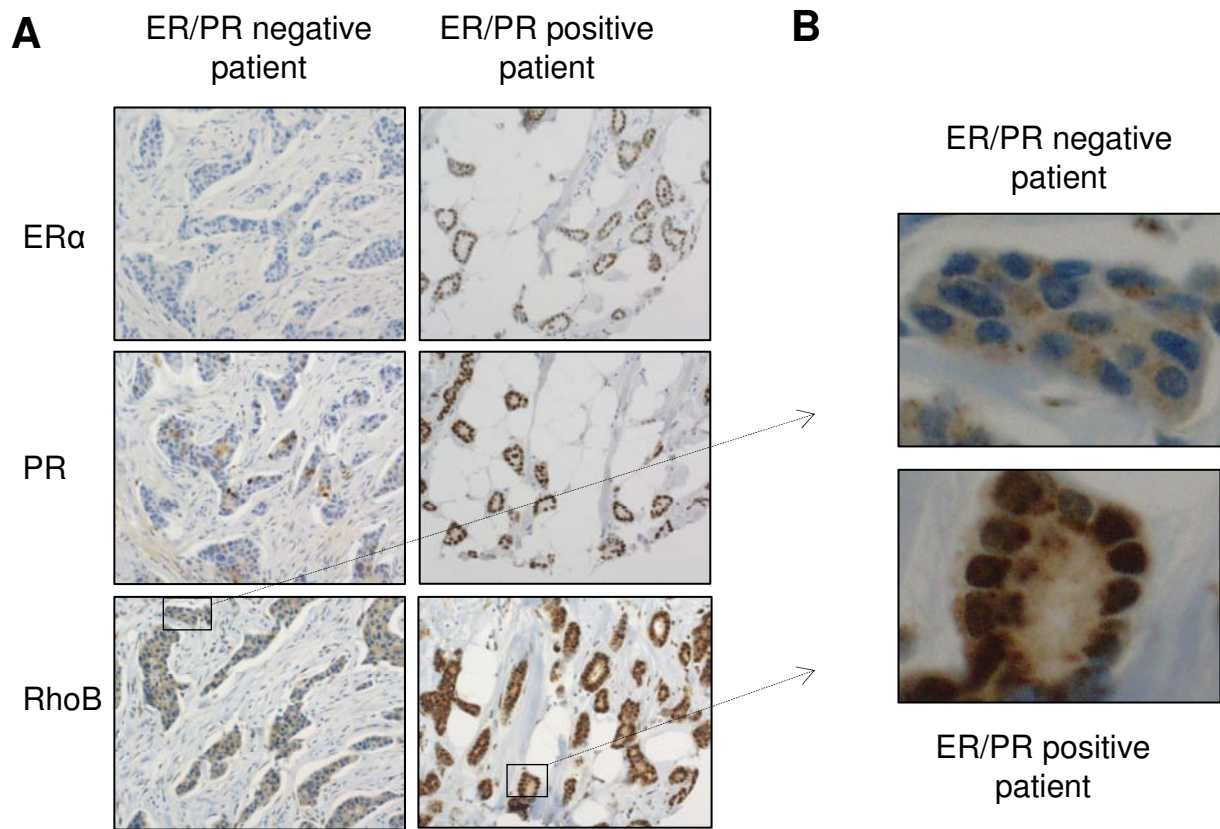
On 6 weeks old mice, uteri were collected and lysed. ER α and RhoB mRNA expressions were determined by qRT-PCR, relative to GAPDH expression. Error bars represent the mean values \pm SD from triplicate conditions. Differences were considered statistically significant at $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**), Student's *t* test. Results are representative of 2 to 3 independent experiments.

Supplemental Figure 3: Effect of RhoB inhibition on ER α dependant transcription and on ER α mRNA levels

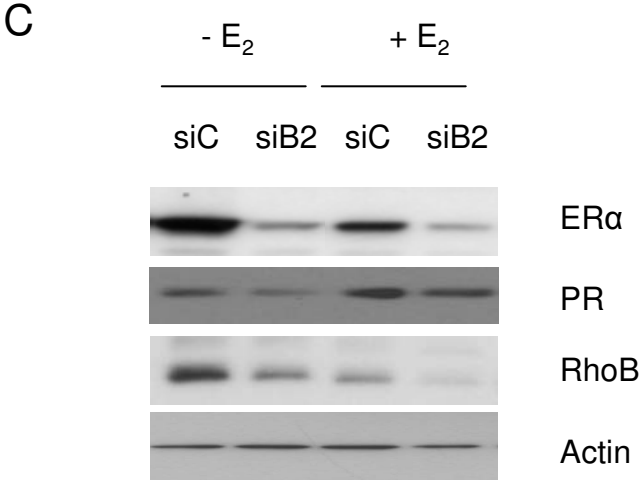
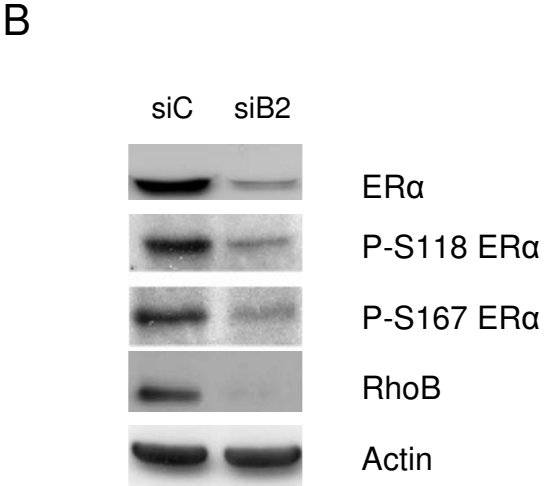
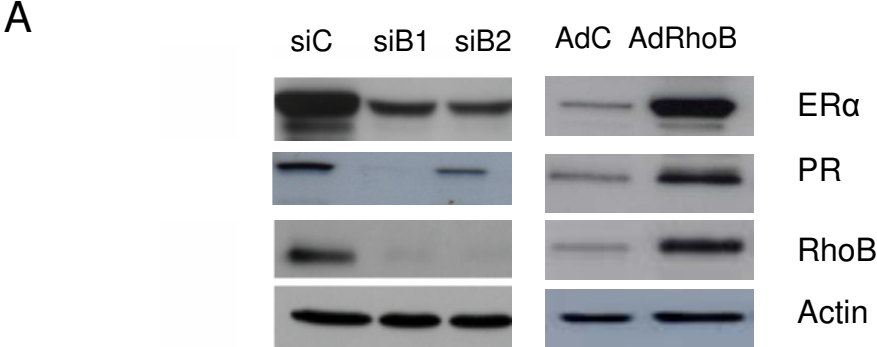
A: MELN cells were transfected with siC, siB1 or siB2. Three days later, cells were deprived of E₂ for 3 additional days and then treated for 16h with E₂ or ethanol. Luciferase activity was quantified and normalized. Error bars represent the mean values \pm SD from 4 independent experiments. The data generated in the absence of E₂ are enlarged in the upper right corner.

B: MCF-7 cells were transfected with siC, siB1 or siB2. Three days later, cells were deprived of E₂ for 3 additional days. Cells were then treated for 16h with E₂ or ethanol and expression of ER α gene was measured. Error bars represent the mean values \pm SD from triplicate conditions, representative of 2 independent experiments.

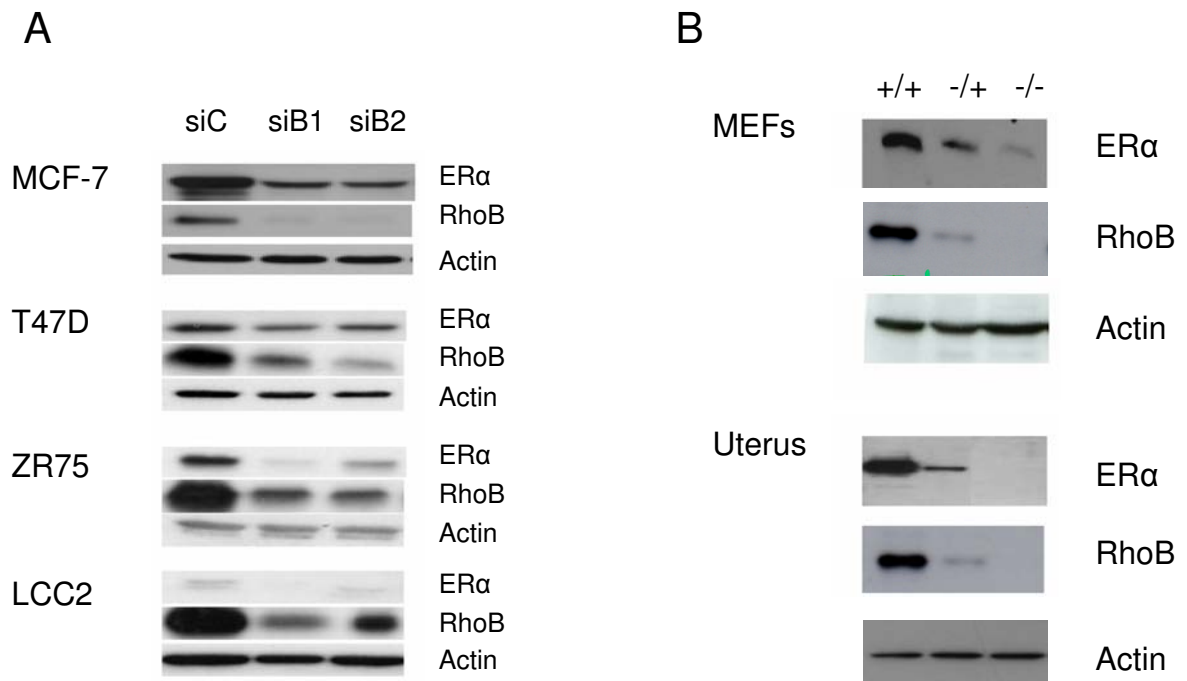
Meunier, Figure 1



Meunier, Figure 2

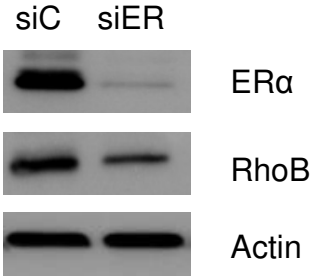


Meunier, Figure 3

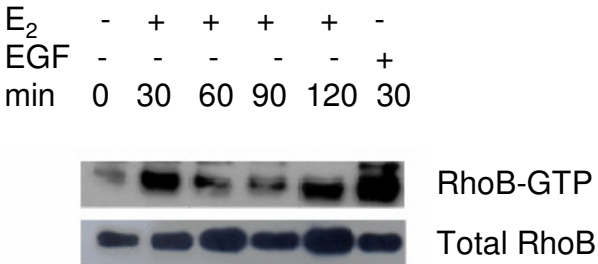


Meunier, Figure 4

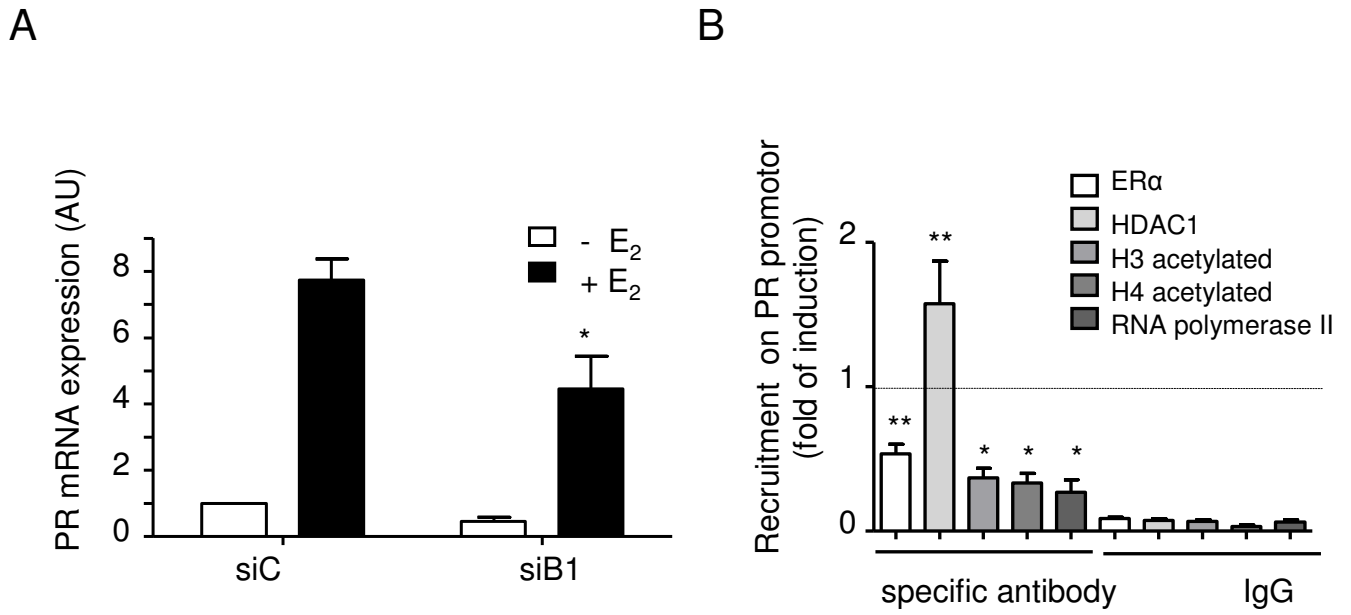
A



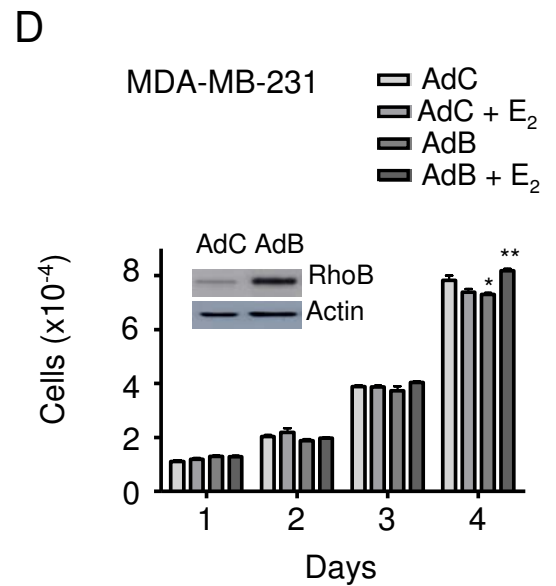
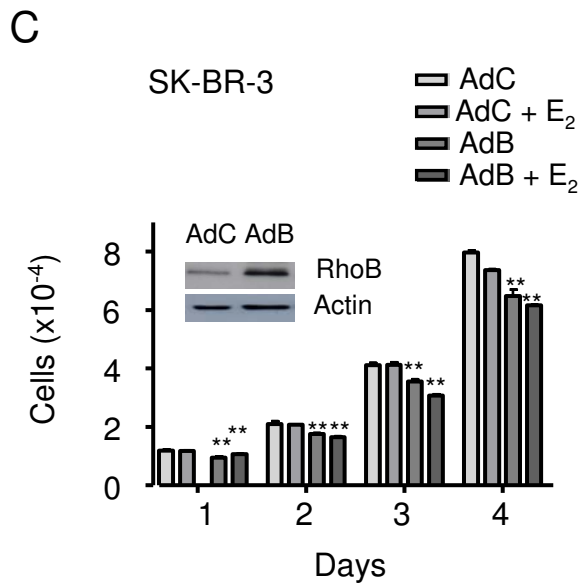
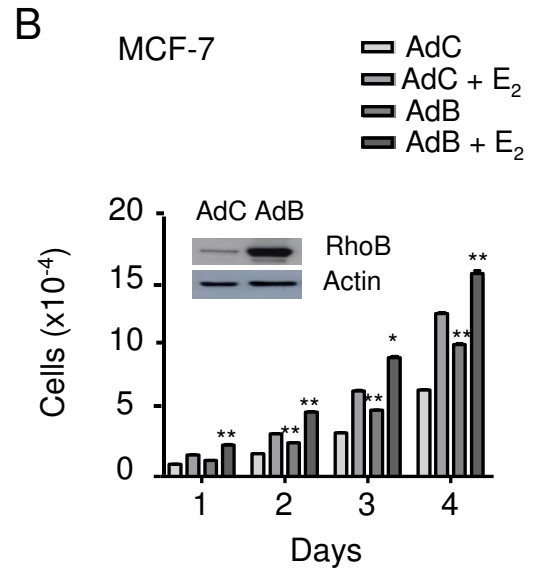
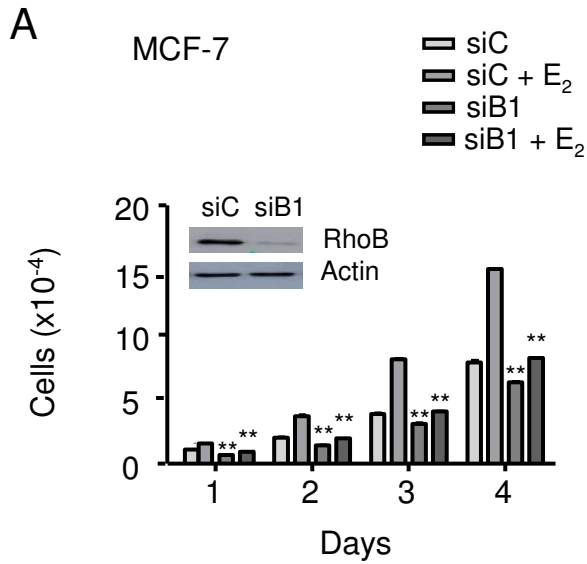
B



Meunier, Figure 5



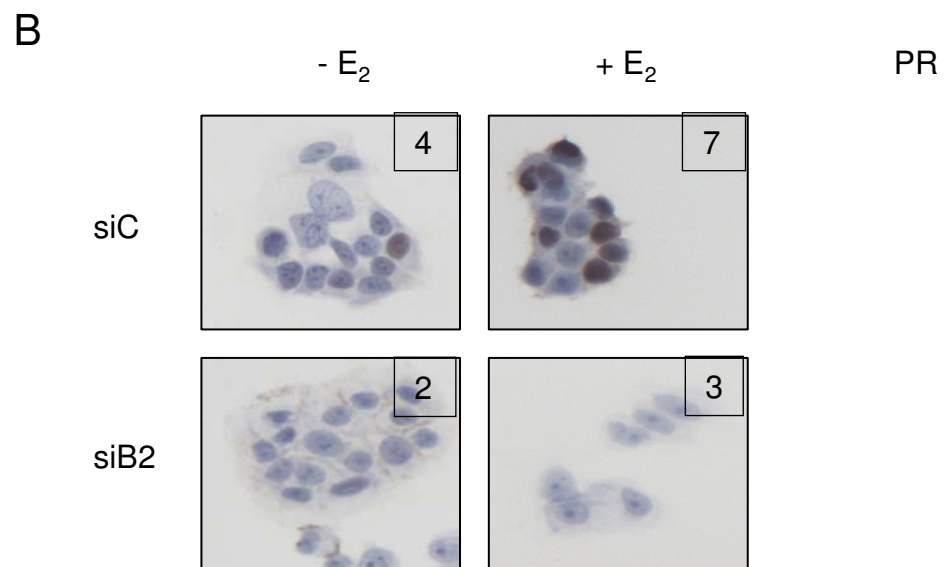
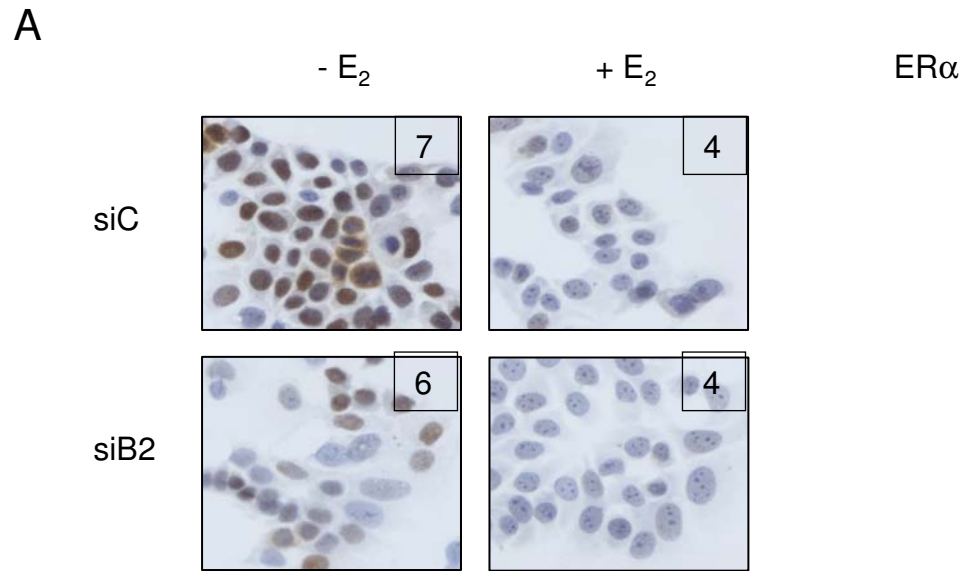
Meunier, Figure 6



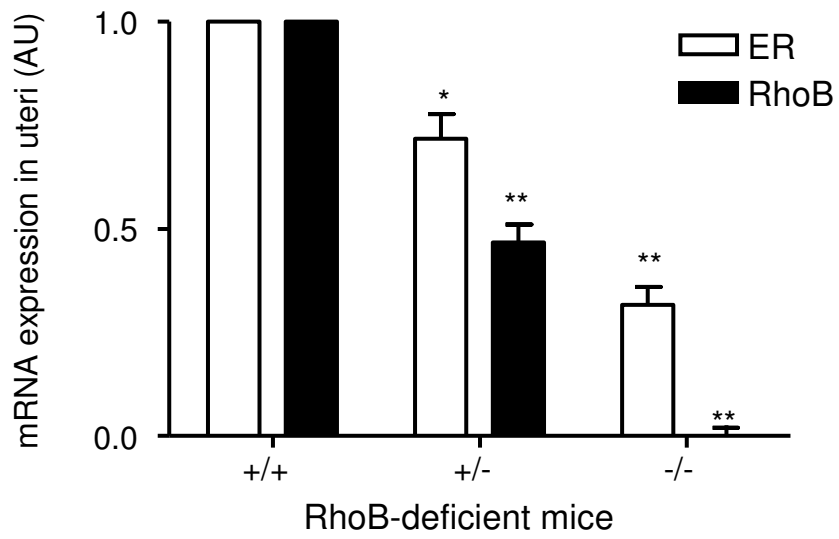
Meunier, Supplemental Table 1

	No adjuvant tamoxifen treatment n = 51	Tamoxifen adjuvant treatment n = 62	p	Total n = 113
Age median [range]	58 [48-74]	60 [51-74]	0.1284	60 [48-74]
Lymph nodes negative	25 (49%)	14 (23%)	0.0039	39 (34.8%)
Lymph nodes positive	26 (51%)	47 (77%)		73 (65.1%)
Missing data	0	1		1
Histological size <2 cm	21 (45.7%)	16 (27.1%)	0.0486	37 (35.2%)
Histological size ≥ 2 cm	25 (54.3%)	43 (72.9%)		68 (64.8%)
Missing data	5	3		8
Grade I and II	31 (62%)	34 (55.7%)	0.5052	65 (58.6%)
Grade III	19 (38%)	27 (44.3%)		46 (41.4%)
Missing data	1	1		2
Number mitose/ mm ² : median [range]	2.5 [0.4-13.0]	5.1 [0.4-13.0]	0.0556	3.8 [0.4-13.0]
Ductal carcinoma	44 (86.3%)	47 (75.8%)	0.4377	91 (80.5%)
Lobular carcinoma	4 (7.8%)	9 (14.5%)		13 (11.5%)
others	3 (5.9%)	6 (9.7%)		9 (8.0%)
ERα positive	34 (68%)	40 (64.5%)	0.6987	74 (66.1%)
ERα negative	16 (32%)	22 (35.5%)		38 (33.9%)
Missing data	1	0		1
PR positive	30(60%)	29 (46.7%)	0.1634	59 (52.7%)
PR negative	20 (40%)	33 (53.2%)		53 (47.3%)
Missing data	1	0		1
LVI positive	11 (22.8%)	12 (21.8%)	0.9383	23 (221.1%)
LVI negative	38 (77.6%)	43 (78.2%)		81 (77.9%)
Missing data	2	7		9

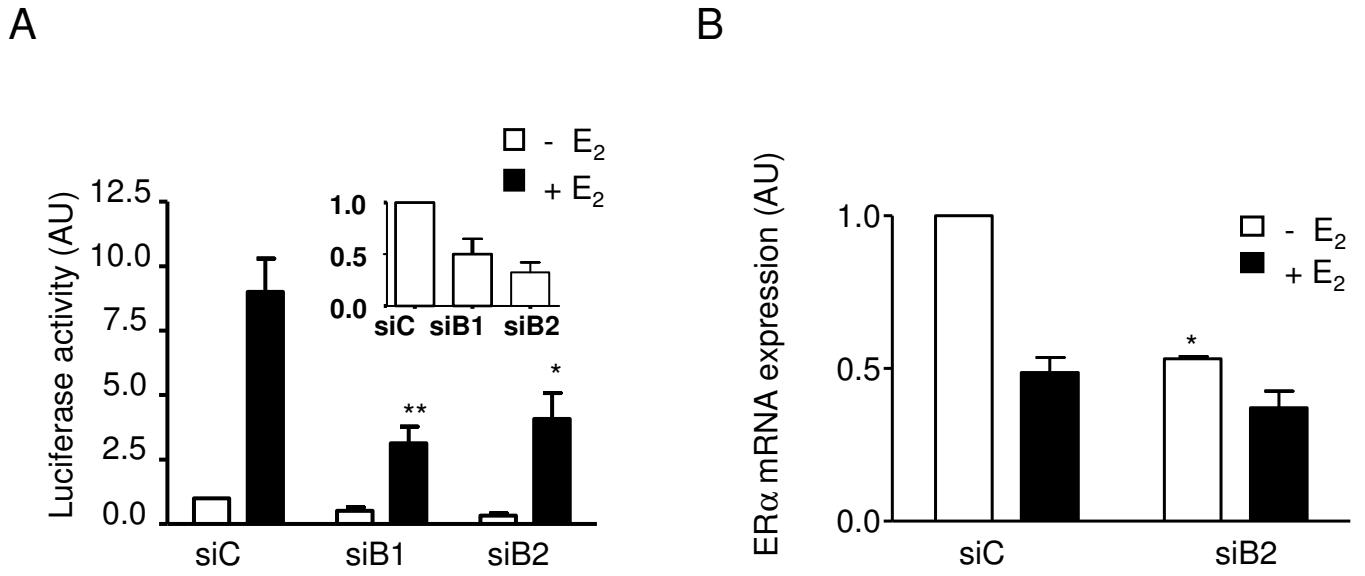
Meunier, Supplemental Figure 1



Meunier, Supplemental Figure 2



Meunier, Supplemental Figure 3



Discussion

Alors que la fonction de suppresseur de tumeur de RhoB est bien documentée dans plusieurs types de cancers, nous avons démontré que la surexpression de RhoB peut être associée à la progression des tumeurs mammaires hormonodépendantes.

Dans cette étude, nous avons montré l'existence d'un dialogue entre RhoB et le RE α ainsi que le rôle de RhoB dans la prolifération des cellules de cancer du sein RE positives.

Tout d'abord, nous démontrons dans des tissus mammaires issus de patientes une forte corrélation entre l'expression de RhoB et celle des RH. De plus, l'expression de RhoB est associée à un faible grade et une petite taille de la tumeur suggérant que RhoB est un marqueur de bon pronostic. Nous avons ensuite démontré que RhoB contrôle les taux du RE α et du RP que ce soit en présence ou en absence d'E₂ dans des lignées RE positives. Les phosphorylations des sérines 118 et 167 peuvent constituer des marqueurs de bon pronostic dans les cas de cancers du sein [73 Murphy, 2004 #44]. Nous avons mesuré une diminution de la phosphorylation de ces deux résidus lors de l'extinction de la protéine RhoB. Cette diminution est cependant corrélée à la diminution importante des taux de RE α en présence ARN interférent dirigé contre RhoB. Le ratio des taux de RE α phosphorylé sur le RE α total est inchangé entre les conditions contrôle et lors de la diminution de l'expression de RhoB suggérant que RhoB n'intervient pas dans les voies de signalisation contrôlant la phosphorylation du RE α .

Nous démontrons également qu'*in vivo*, RhoB contrôle l'expression du RE α dans les utérus et des MEFs issus de souris invalidée pour le gène *RhoB*. La forte diminution de l'expression du RE α dans ces souris ne doit pas être totale. En effet, les souris invalidées pour RhoB sont fertiles alors que celles qui le sont pour le RE α sont stériles.

Nous avons également démontré qu'à l'inverse, le RE α contrôle l'activation et l'expression de RhoB. De plus, un traitement par E₂ induit une augmentation de la fraction de RhoB lié au GTP

au bout de 30 minutes sans changement de l'expression de RhoB total. Dans la mesure où l'expression du RE α est fortement diminuée sous ARNi dirigés contre RhoB, nous avons recherché si cela avait un impact sur l'expression du RP, en tant que gène cible du RE α . L'expression de ce récepteur est systématiquement recherchée dans les tumeurs mammaires du fait de son implication dans la prolifération cellulaire. Les taux d'ARNm, ainsi que ceux de la protéine RP, sont significativement diminués suite à l'extinction de RhoB. Une diminution du recrutement du RE α , de l'ARN polymérase II ainsi que des histones H3 et H4 acétylées sur le promoteur du RP a été observée, parallèlement à une diminution du recrutement du corépresseur HDAC1. Ces résultats démontrent le rôle important de RhoB dans le recrutement de cofacteurs liés au RE α afin de modifier la transcription de gènes cibles.

Enfin, nous avons mis en évidence que l'extinction de RhoB diminue la prolifération de cellules RE positives (MCF-7) et non des cellules RE négatives (MDA-MB 231 et SK-BR-3). Cet effet renforce l'hypothèse selon laquelle RhoB favorise la prolifération cellulaire *via* l'expression du RE α . De plus, ces résultats suggèrent que l'extinction de RhoB dans des cellules du cancer du sein peut être associée à la progression tumorale et parallèlement à une extinction du RE α . La chronologie de ces deux événements reste encore à élucider.

En conclusion, nos résultats montrent que RhoB est un régulateur de l'expression de RE α et suggèrent que le rôle de suppresseur de tumeur du gène *rhoB* est dépendant du type cellulaire. Il aurait donc un rôle de pro-oncogène dans le cas de cellules de cancers du sein hormonodépendantes.

II. RhoA et RhoC modulent différemment le recrutement du RE α et la transcription associée selon les gènes cibles, dans les cellules MCF-7.

Introduction

Parallèlement au travail sur les interrelations entre RhoB et le RE α , nous avons mené une étude sur l'implication des deux autres protéines Rho, RhoA et RhoC, dans la signalisation du RE α dans des lignées de cancers du sein.

En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, bien que très proches au niveau de leurs séquences (85% d'homologie), les protéines RhoA, B et C ont des rôles différents. Elles sont souvent surexprimées ou suractivées dans les cancers du sein [14] et les rôles de RhoA et RhoC dans les cancers du sein ont été plus étudiés que celui de leur homologue RhoB.

Il a été montré que le microARN-31 (mir-31) supprime les métastases de cancers du sein en régulant entre autre l'expression de RhoA [189]. De plus récemment, un complexe transcriptionnel Myc-Skp2-Miz1 a été montré comme étant indispensable pour la transcription de RhoA, l'invasion cellulaire et le processus métastatique [190].

Le rôle de RhoC a été très largement étudié dans les cancers du sein dits inflammatoires [174, 200, 343]. Très récemment, l'équipe de S. Meravjjer a mis en évidence les rôles différents de RhoA et RhoC dans des cellules de cancers du sein RE négatives. Le rôle de RhoC comme modulateur positif de l'adhésion et de la formation de métastases *via* l'adhésion à la matrice cellulaire et la signalisation des intégrines a été mis en avant [204].

Cependant, le rôle respectif de RhoA ou RhoC dans le déterminisme du statut hormonal des tumeurs, qui concerne à la fois l'expression du RE α et de RP, n'a pas été étudié.

Au sein du laboratoire, notre équipe a démontré grâce à la C3 exoenzyme, l'implication des 3 protéines RhoA, RhoB et/ou RhoC dans l'activation transcriptionnelle du RE α [197]. L'équipe de Su est arrivée aux mêmes résultats en utilisant la C3 exoenzyme mais également un mutant

dominant négatif de RhoA et également des mutants constitutivement actifs de RhoA, Rac1 et cdc42 [195].

Le rôle de cette étude a donc été de mieux comprendre les effets de RhoA et RhoC sur la transcription dépendante du RE α . Pour cela, nous avons utilisé les cellules MCF-7 et les cellules MELN. Ces dernières dérivent des cellules MCF-7 mais expriment de façon constitutive le gène codant la luciférase sous le contrôle du promoteur de la globine auquel a été associé la séquence ERE consensus de la vitellogénine. Nous avons analysé l'effet de la diminution de RhoA et de RhoC, d'une part sur le recrutement du RE α sur 4 gènes, et d'autre part sur l'expression de ces mêmes gènes cibles.

Certains de ces gènes contiennent une ERE consensus par exemple pS2 (position -404 à -392) et la construction du gène codant la luciférase contenant l'ERE de la vitellogénine (site de liaison du RE α en position +52 à +65) [344 , 345]. Pour le récepteur de la progestérone, nous avons utilisé des amorces qui encadrent un site de liaison de type AP-1 en position +745 sur lequel il est connu que le RE α se lie [346]. Et enfin pour la cathepsine D, les amorces utilisées encadrent un site de liaison distal en position -261 à -156 [347].

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'importance de RhoA et RhoC pour le niveau d'expression du RE α . L'ensemble de ces données nous a permis d'identifier un rôle différent de RhoA et RhoC sur la transcription dépendante du RE α .

RhoA and RhoC differentially modulate estrogen receptor α recruitment,
transcriptional activities and expression in MCF-7 cells

Elise Meunier^{1,2,3*}, Emilie Malissein^{1,2*}, Isabelle Lajoie-Mazenc^{1,2,3}, Gilles Favre^{1,2,3},
Florence Dalenc^{1,2}, Sophie F. Doisneau-Sixou^{1,2,3}

¹- Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31300, France

²- INSERM U563, Toulouse, F-31300, France

³- Université de Toulouse, Toulouse, F-31300, France

* Elise Meunier and Emilie Malissein are co first authors of this work

EMe meunier.elise@claudiusregaud.fr

EMa emiliemalissein@yahoo.fr

ILM lajoie-mazenc.isabelle@claudiusregaud.fr

GF favre.gilles@claudiusregaud.fr

FD dalenc.florence@claudiusregaud.fr

SDS doisneau-sixou.sophie@claudiusregaud.fr

Corresponding authors

Sophie Doisneau-Sixou and Gilles Favre

Institut Claudius Regaud, 20-24 rue du pont St Pierre, 31052 Toulouse France

Tel +33 (0)5 61 42 42 23

Fax : +33 (0)5 61 42 46 31

E-mail : doisneau-sixou.sophie@claudiusregaud.fr and favre.gilles@claudiusregaud.fr

Abstract

Introduction:

RhoA and RhoC are closely related small GTPases and clearly involved in breast cancer tumorigenesis. Nonetheless, their specific roles in the control of estrogen receptor alpha (ER α) activities have not been elucidated so far.

Methods:

We used siRNA sequences to specifically down-regulate RhoA and RhoC expressions in ER α positive breast adenocarcinoma MCF-7 cells. We then analyzed ER α recruitment on 4 target genes, their mRNA levels and ER α expression. Besides, we studied the effect of estradiol on the activation state of RhoA.

Results:

We showed that RhoA and RhoC modulate ER α recruitment on the vitellogenin estrogen responsive element present in a luciferase reporter gene, and on the promoters of *PR*, *cathepsin D* and *pS2*. RhoA deficiency induces on the one hand an up-regulation of the ERE-luciferase reporter gene and of PR mRNA expression and the other hand down-regulates cathepsin D and slightly pS2 mRNA expressions. Conversely, Rho C inhibition has no significant effect. Besides, RhoA, and to a lesser extent RhoC inhibition, increase ER α expression, with no alteration of its mRNA level suggesting potential post-translational controls. Finally, we generated data demonstrating that estradiol can rapidly activate RhoA to its GTP bound-state.

Conclusions:

Altogether, our results strongly suggest that the 3 homologous RhoA, B and C small GTPases play different but clear roles in ER α signaling. They are definitely involved in ER α recruitment and to some extent in ER α cofactor balance. The relevance of such crosstalk has to be investigated further in breast cancers.

Introduction

Approximately two thirds of the cases of breast cancer express the Estrogen Receptor alpha (ER α) and/or Progesterone Receptor (PR). Hormone therapy is then recommended, but although largely effective, there are many cases of systemic primary or secondary resistance to the treatment. A number of studies have addressed the question of the origin and mechanisms of resistance to hormone therapy [1]. ER α signaling is a complex network involving multiple partners according to each cell type as ER α transcriptional effects are not only determined by ligands as estradiol (E₂), but also by crosstalk between ER α and growth factor signalling [2]. In some cell contexts, ER α interacts directly with c-Src and other cytoplasmic signaling and adaptor molecules, such as Shc, PI3K, MNAR and p130. The hierarchy among these associations is not known and other growth factor receptors are likely to be required, e.g. EGF or IGF-1 [2]. Prenylated proteins such as Rho small GTPases are key elements in crosstalk and integration of growth factor signal transduction pathways. Indeed, a variety of growth factors present in the tumor microenvironment activate Rho proteins [3].

Rho proteins are part of the extensive Ras superfamily that shuttle between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form and exhibit intrinsic GTPase activities. They form interactions with a variety of regulators and effectors that modulate activity and influence important processes in cancer, including neoplastic transformation, survival, invasion, and metastasis [4]. Rho GTPases, including RhoA, RhoB, and RhoC, have been implicated in the control of several critical cellular functions, including regulation of the actin cytoskeleton, cell proliferation, and oncogenesis [5]. RhoA, RhoB and RhoC are closely related to Ras oncogenes, highly conserved and homologous (85% amino acid identity). Although no constitutively active mutants of Rho GTPases have been detected in human tumors, [6-9] and reviewed in [10] and [4], a correlation has been demonstrated between Rho protein overexpression and poor clinical outcome in breast cancers, [11] and reviewed in [12]. RhoB

rapidly appeared as an immediate early response gene [13-16] with tumor suppressive functions in human cancer cells [17, 18]. But strikingly, specific RhoB overexpression has been correlated to disease progression [7] although this correlation is controversial [19]. We recently documented a feed-forward loop between RhoB and ER α suggesting the role of RhoB in tumorigenesis involving a dual effect depending on the cellular context, with a potential pro-oncogenic function in hormone dependant breast cancer cells (data submitted). Besides, RhoA and RhoC involvement in carcinogenesis is extensively documented [3, 20, 21]. MicroRNA-31 (miR-31) was shown to suppress breast cancer metastasis partly through down-regulation of RhoA gene expression [22]. It was recently published that the Myc–Skp2–Miz1 transcriptional complex is critical for RhoA gene transcription, cell invasion and cancer metastasis [23]. Regarding RhoC, the key role of its overexpression has been evidenced in inflammatory breast cancer cell invasion [24-27]. Recently, RhoA and RhoC have been shown to play different roles in ER α negative poorly differentiated breast cancer cell lines, outlining RhoC as a dominant modulator of adhesion and metastatic features in breast cancer, through cell-matrix adhesion and integrin signaling [28, 29].

Important proteins regulate the Rho GTPase activity and the downstream effectors that are involved in cancer phenotypes: the GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors), the GAPs (GTPase Activating Proteins) and the GDP Dissociation Inhibitors (RhoGDIs). Breast tumor progression is accompanied by a decrease in expression of the pro-oncogenic RhoGEF Tiam1 [30]. Moreover, expression of Rho-GDI α , a negative regulator of Rho proteins is reported to correlate with the outcome of patients with breast cancer treated by adjuvant chemotherapy [31].

From a molecular point of view, scaffold proteins involved in Rho functions, such as Rho-GDI or DbpA, have been observed as part of ER α -containing complexes [32, 33] where direct interaction between ER α and Rho-GDI has been demonstrated [34]. Rho-GDI signaling

provides now new potential targets for cancer therapy [35]. Besides, we and other already demonstrated that Rho GTPases are important modulators of ER α transcriptional activation [33, 36] and the specific role of RhoB in ER α and HDAC1 recruitments (submitted data). Thus, the main goal of the present study was to determine the specific involvement of RhoA and RhoC in ER α signaling and in particular through ER α transcriptional recruitment, in hormone-dependent breast cancer cells.

Materials and Methods

Cell culture and reagents

The human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 was obtained from the American Tissue Culture Collection. Development of stable transfectants of MCF-7 cells (called MELN cells) has been described previously [37]. These cells, kindly provided by P. Balaguer (INSERM 540, France), were established by transfecting MCF-7 cells with ERE- β -globin-luc-SV-Neo plasmid and thus express luciferase in an estrogen-dependent manner. Cells were grown routinely in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM, *Lonza*), supplemented with 5% fetal bovin serum (FBS, *Pan*). Cells were treated with E₂, ICI182, 780 (*Sigma*) or EGF (*Sigma*) as indicated.

SiRNA transfection

Transient transfection of siRNA was performed using Oligofectamine[®] according to the manufacturer's instructions in OptiMEM (*Invitrogen*). The siRNA sequences of the oligonucleotide duplexes (*Eurogentec*) were siA1 (5'-GAAGUCAAGCAUUUCUGUC-dTdT-3') and siA2 (5'-GCAGGUAGAGUUGGCCUUUG-dTdT-3'), specific for 2 independent coding regions of *RhoA*, siC1 (5'-UAAGAAGGACCUGAGGCAAdTdT-3') and siC2 (5'-GACUAUGAUCGACUGCGGC-dTdT-3'), specific for 2 independent coding regions of *RhoC*, siER (5'-GGGAGAAUGUUGAAACACA-dTdT-3'), specific for a coding region of *ER α* and the non-specific sequence siControl (siC), (5'-GACGUGGGACUGAAGGGGU-dTdT-3'). When indicated, cells were deprived of E₂, 3 days after transfection, by growing them in phenol red-free medium containing 5% DCC-FBS for 3 additional days, and then by treating them with E₂ or ethanol for the indicated times.

Western blot analysis

Cells were lysed into lysis buffer as already described [38]. Cell extracts were separated by SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes (*Amersham*). Proteins were visualized using the enhanced detection system (*Amersham*) and the following antibodies against RhoA (sc-418), RhoB (sc-180), ER α (sc-543) from *Santa Cruz Biotechnology*, β actin (MAB1501) from *Chemicon*, and the secondary antibodies antimouse (MP21120) and antirabbit (MP23145) horseradish peroxidase from *Interchim*. Protein abundance was quantified by densitometric phosphoimager analysis (*GE healthcare*). Relative band intensities were quantified by densitometric analysis.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIp) Assay

ChIp assays were performed with modifications of the procedure of Metivier [39], as described. Briefly, 10⁶ cells were synchronized by 3 days of culture in DMEM 5% DCC-FCS and then treated during 1h with E₂ (50 nM) or ethanol (control). Antibodies used for the immunoprecipitation were ER α (sc-543) or HDAC1 (sc-6299) from *Santa Cruz Biotechnology*.

Quantitative PCR were performed on an iCycler (*Biorad*) using the following primers (*Eurogentec*): 5'- CGA CTC TAG CGG AGG ACT GTC CTC CGT GC -3' and 5'- GGC GCC GGG CCT TTC TTT ATG TTT TGG C -3' to amplify the fragment of the human vitellogenin ERE [37] 5'-GGCGACACAGCAGTGGGGAT-3' and 5'-TCTCCTCCCTCTGCCCCTATATTC-3' to amplify the fragment of the human PR promoter flanking the + 745 AP-1 DNA binding motif where ER α is known to bind; 5'-CTCAGGTAGAAGGAGAAGATG-3' and 5'-CTGGGCGGTGTCAAAGTG-3' to amplify the fragment of the human cathepsin D [40] 5'- GGC CAT CTC TCA CTA TGA ATC ACT

TCT GC -3' and 5'- GGC AGG CTC TGT TTG CTT AAA GAG CG -3' to amplify the fragment of the human pS2 [41]. For the purifications of inputs, 20 μ l of extract were removed and heated at 65°C, DNA was then purified as for the immunoprecipitates, and was quantified by quantitative PCR as described below. The specificity of the immunoprecipitation of ER α was controlled by the use of rabbit IgG instead of the polyclonal anti-ER α antibody (Data not shown).

Quantitative Reverse Transcribed PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated 16h after stimulation by E₂, using RNeasy kit according to the manufacturer's instructions (*Qiagen*), then reverse-transcribed using iScriptTMcDNA Synthesis Kit (*Biorad*). Quantitative PCR was performed with an iQreal-time PCR detection system (*Biorad*) using iQTM SYBR® Green Supermix (*Biorad*). The primer pairs used were: for GAPDH, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; for 28s 5'-TCGCTGGGTCTTGGATGTC-3' and 5'-AGCAGATTGTGACAGACCATTCC-3'; for ER α 5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3' and 5'-GGT CTTTTCGTATCCCACCTTTC-3'; for PR 5'-CGCGCTCTACCCTGCACTC-3' and 5'-TGAATCCGGCCTCAGGTAGTT-3' ; for pS2 5'-CCTCCCAGTGTGAAATAAGG-3' and 5'-TCGAGGGACGTGATGGTAT-3' and for cathepsin D 5'-TGAGGCCATTGTGTGGACAGGCA-3' and 5'-GTACGGTCAAACACAGTGTAGT-3' (*Eurogentec*).

Luciferase assay

3 days after siRNA transfection, MELN cells were seeded in 12 well plates in DMEM-DCC FBS during 3 days. They were then treated with 50 nM E₂ or ethanol for 16 h. Cells were then lysed in RLB (Reporter Lysis Buffer, *Promega*). The luciferase activity was measured

with LAR (Luciferase Assay Reagent, *Promega*) according to the manufacturer's instructions. Protein concentration was measured using Bicinchoninic Acid (BCA, *Sigma*) to normalize the luciferase activity data.

GST pull-down assay

The level of activated RhoA, GTP-bound RhoA protein was measured using the GST fusion protein containing the Rho binding domain of the downstream effector Rhotekin and adapted to RhoA [38]. The amount of GTP-bound and the total amount of RhoA in cell lysates were determined by Western blot using polyclonal anti RhoA antibodies (sc-418, *Santa Cruz Biotechnology*).

Statistical analysis

Student's *t* test was performed to compare the means of values from different experiments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), and $p < 0.001$ (***)).

Results

RhoA and RhoC down-regulations differentially modify ER α recruitment on 4 target genes in MCF-7 cells:

To study RhoA and RhoC involvement in ER α recruitment, transcriptional activities and expression, we used two specific siRNA sequences for each small GTPase: siA1 and siA2 designed *versus* RhoA mRNA and siC1 and siC2 designed *versus* RhoC mRNA. We evaluated the siRNA efficiency and specificity regarding the 2 other Rho proteins in the presence of estrogens: mRNA levels were measured by real time RT-PCR (Additional figure 1A) and RhoA and RhoB proteins expressions were confirmed by Western Blot (Additional figure 1B). We observed a significant decrease of RhoA mRNA levels with siA1 and siA2 (82.3 % \pm 3.1 and 59.3% \pm 1.5 respectively. RhoC mRNA levels were decreased to around 60 % in the presence of both siC1 and siC2 (62 % \pm 1.5 and 57% \pm 0.8 respectively). These sequences did not induce any non specific inhibition of RhoB and of RhoA or C. We confirmed that siA1 and siA2 induced 80% protein inhibition of RhoA (Additional figure 1B), without any decrease of RhoB protein expression. Similarly, neither siC1 nor siC2 decreased RhoA or RhoB expression. The same results were confirmed in MELN cell line (data not shown). In our experimental conditions, the siRNA treatment did not alter significantly MCF-7 proliferation (data not shown).

We were then able to study, using chromatin immunoprecipitation (ChIP), the effect of RhoA and RhoC down-regulation on ER α recruitment after 1h of estrogen stimulation (Figure 1A). We first used a vitellogenin model, with MELN cell line. MELN cells are MCF-7 cells that express luciferase in an estrogen-dependent manner as the promoter of the stably transfected plasmid contains the consensus vitellogenin ERE [37]. We showed that both RhoA and RhoC down-regulations induce a significant increase of ER α recruitment, at least 2 fold compared to control conditions, on the ERE-luciferase promoter.

Then, we extended the study with 3 physiological target gene promoters of ER α . For pS2 promoter, around 2.5 fold increases have been observed in the presence of both siA2 and siC2. On the contrary, RhoA and RhoC down-regulations lead to a decrease of ER α association on PR promoter (rate of 0.5 and 0.4 respectively) and on cathepsin D promoter (rate of 0.5 to 0.7). These results show that in MCF-7 cells, RhoA and RhoC down-regulations have similar statistically significant effects on ER α recruitment for a specific gene but that these effects are specific of each target gene.

We performed similar experiments by studying not ER α but HDAC1 recruitment on those 3 promoters (Figure 1B). Neither RhoA nor RhoC down-regulation could affect HDAC1 recruitment on pS2, PR, Cathepsin D (Figure 1B) or cyclin D1 (data not shown) promoters. We already showed that RhoA down-regulation has no effect on HDAC1 expression (submitted results).

RhoA but not RhoC down-regulation increases an ERE-luciferase reporter gene and PR mRNA levels and can decrease cathepsin D and pS2 mRNA levels

We hypothesized that the ability of RhoA and RhoC to modulate ER α recruitment could control its major transcriptional functions. The evaluation of luciferase activity in MELN cells is representative of ER α -dependant transcription (Figure 2A). In control cells, a 9 fold induction of the luciferase activity by E₂ was observed. The E₂ induction was changed to factors of 11 and 6 for siA1 and siA2 respectively. In the absence of E₂, siA2 only increased the luciferase activity whereas in the presence of E₂, both siA1 and siA2 significantly increased it. Besides, RhoC down-regulation had no effect on the luciferase activity, neither in the presence nor in the absence of E₂.

We then followed the effect of RhoA and RhoC down-regulation on the mRNA level of the 3 target genes of ER α already described in Figure 1. For PR (Figure 2B), E₂ increased 8.7 fold

its mRNA level. In the absence of E₂, both siA1 and siA2 slightly increased the mRNA levels whereas in the presence of E₂, both siA1 and siA2 significantly increased it. In the presence of E₂, RhoA down-regulation lead to 1.4 and 1.6 fold increases for siA1 and siA2 respectively. As observed above, the E₂ induction was not dramatically changed (9 and 5.8 fold for siA1 and siA2 respectively). Again, RhoC down-regulation had no effect on the *PR* mRNA level, neither in the presence nor in the absence of E₂.

By comparing the results of Figure 1A and Figures 2A and B, it appears that RhoA down-regulation induces an increase of both the luciferase activity and of *PR* mRNA level, but only the latter one is related to an increase of ER α recruitment (on *PR* promotor).

For *cathepsin D* gene (Figure 2C), E₂ alone allows a 3.4 fold increase of the mRNA level, whereas then, RhoA down-regulation lead to a 0.4 fold decrease of this level. In the absence of E₂, RhoA had no effect. For *pS2* gene (Figure 2D), E₂ allows a 3.9 fold increase of the mRNA level and RhoA down-regulation lead to a significant 0.2 fold decrease of this level, only using siA2. In the absence of E₂, RhoA had again no effect.

For both genes, RhoC down-regulation had no effect on the mRNA level, neither in the presence nor in the absence of E₂.

Altogether these results suggest that RhoA down-regulation can negatively control ER α -dependant transcription, in correlation with a decrease of ER α recruitment for the *cathepsin* gene.

RhoA down-regulation, but not RhoC, increases ER α expression, with and w/o E₂, at the protein level only in MCF-7 cells

We hypothesized that the ability of RhoA to modulate the major transcriptional functions of ER α could be explained by a control of ER α expression. To examine this hypothesis, we analyzed the effect of RhoA inhibition on ER α expression, both at the protein and mRNA

levels (Figure 3). In Figure 3A, we first confirmed the dramatic decrease of ER α expression in control condition after 16h of E₂ stimulation [37]. Interestingly, in the presence of siA1 and siA2 siRNA, we observed a significant increase of ER α expression, both in the presence and the absence of E₂. It is noteworthy that RhoC down-regulation did not alter ER α expression in the absence of E₂ but could increase it in the presence of E₂. In Figure 3B, results of the effects of RhoA and RhoC down-regulations on ER α mRNA expression are presented. Besides the decrease of ER α expression due to E₂ stimulation, neither RhoA nor RhoC down-regulation could alter ER α mRNA levels. Altogether, these results show that RhoA, and to a lower extent RhoC, can negatively regulate ER α expression although this regulation is not transcriptional.

E₂ activates RhoA, after 2h, via ER α

Given that the activation of RhoA is important for its physiological effect [5], we also investigated the role of estrogen stimulation on the RhoA guanine nucleotide binding status using a small GTPase pull-down assay (Figure 4A and B), as a strategy to examine rapid effects of E₂ stimulation on RhoA activation as well as expression. We observed, as shown in Figure 4A, that RhoA is activated at 120 min without any change of total RhoA expression at this time point, similar to the effect produced by EGF [42]. We then followed the activation of RhoA in the presence of ICI182,780 (Figure 4B), to determine if this activation is directly dependant on ER α . In the presence of ICI182, 780, no activation of RhoA at 120 min could be recorded, strongly suggesting that ER α is a major actor of RhoA activation by E₂. We then checked if inversely, ER α down-regulation can modulate RhoA expression (Figure 4C), and only a very light but reproducible inhibition (5 to 10%) could be observed. Together these results suggested that RhoA and estrogen signalings were integrated into a cross-talk that may control the biological effects of estrogen treatment.

Discussion

RhoA and RhoC overexpressions are clearly associated with tumor progression and/or metastasis in breast cancers [7, 26]. Their specific involvement in hormone-dependant breast cancers remain to be elucidated. We recently demonstrated a positive cross-talk between RhoB and ER α expressions and the critical role of RhoB in the regulation of the proliferation of breast cancer cells expressing ER α . Moreover, our data demonstrated RhoB control of ER α transcriptional regulation of target genes through the modulation of the recruitment of transcriptional co-regulators and HDAC1 regulation (data submitted).

In the present work, we demonstrated in MCF-7 cells that the recruitment of ER α on *PR* gene was inhibited not only when RhoB was down-regulated but when RhoA and RhoC were too. Similar inhibitions of ER α recruitment were confirmed on 3 other ER α target genes. Indeed, we were able to show that RhoA regulates negatively *PR* and the luciferase controlled by the vitellogenin ERE and regulates positively *pS2* and *cathepsin D* genes. Nonetheless, these regulations are not directly linked to the modulation of ER α recruitment. Only for the *cathepsin D* gene, the clear decrease of the mRNA level is associated to a parallel decrease of ER α recruitment whereas for the vitellogenin ERE, the increase of luciferase activity is associated to a significant increase of ER α recruitment. On the contrary, the modulation of ER α recruitment observed when RhoC is down-regulated is not associated to any control of the target gene transcription. Altogether, these results suggest a key role of RhoA, but not RhoC, as modulator of ER α dependant transcription in MCF-7 cells, independently of its own recruitment.

We then generated data showing that RhoA down-regulation has a clear post-transcriptional stimulatory effect on ER α expression, both in the absence of E₂ and when ER α expression is

down-regulated by E₂. This is the exact opposite effect of RhoB down-regulation, as RhoB deficiency directly correlated to ER α mRNA levels (data submitted). From these results, we strongly hypothesize that RhoA and RhoB both control ER α expression but *via* individual specific mechanisms. Besides, RhoC down-regulation could still increase post-transcriptionally ER α expression but not the basal level of the receptor without its ligand.

In spite of 85% amino acid sequence identity, the different Rho proteins are not functionally redundant but play different roles in cell physiology. Protein level alone does not account for the activity of Rho proteins and it is well established that Rho proteins act as molecular switches by cycling between the inactive and the active GTP-bound state. We already demonstrated that ER α down-regulation significantly decreases RhoB expression (submitted) but had no significant effect in the present work on RhoA in MCF-7 cells. We were nonetheless able to document a cross-talk between RhoA and ER α as E₂ treatment lead to RhoA activation to its GTP-bound state, as previously described with RhoB. E₂ does not modify the total expression of RhoA but can increase active RhoA-GTP forms after 2h of stimulation. Using ICI 182-780, we confirmed that the activation is ER α dependant. These differential effects of a ligand on the 3 Rho proteins is consistent with others: it has been reported that EGFR activation leads to membrane ruffling and reorganization of the cytoskeleton and focal adhesions through activation of members of the Rho proteins [43]. Recent results indicate that RhoA and RhoC play more important roles than RhoB in EGF-mediated migration of trophoblastic cells, and that RhoA and RhoC were activated at the early stage of EGF treatment (within 30 min) whereas RhoB activity was unchanged [42].

Altogether, these results demonstrate that on the one hand RhoA and RhoC proteins modulate ER α recruitment on its target genes and that on the other hand, RhoA is a major actor to

control ER α transcriptional activity. In the specific case of *PR* gene, we are now able to sum up original data regarding the effect of the 3 GTPases (Figure 5). Indeed, the 3 Rho proteins positively modulate ER α recruitment on PR gene (Figure 5A) but only RhoA and RhoB control ER α transcriptional activity on PR expression with opposite effects (Figure 5B), (data regarding RhoB and PR submitted).

Our data strongly suggest that two different cross-talks exist between ER α and either RhoA or RhoB that include expression and activation controls. The 3 Rho protein control ER α expression and/or recruitment with no direct consequence on ER α target gene expressions. A relevant hypothesis is that the Rho protein action on ER α dependant transcription is completed by the differential expression of specific cofactors, such as HDAC1, SRC-1, SRC-3. We recently described the dramatic inhibition of HDAC1 expression in RhoB deficient mice and that RhoB controls HDCA1 recruitment on the promoters of pS2 and PR (submitted). We demonstrate here that RhoA down-regulation has no effect on HDAC1 expression and recruitment on 4 ER α target gene but the effect of RhoA on other relevant cofactors has to be investigated further.

Conclusions

In conclusion, our data define the role of the 3 RhoA, RhoB and RhoC proteins as modulators of ER α signaling with individual specificities on ER α cofactor balance. Those specificities may determine their specific involvement in hormone-dependant breast cancers oncogenesis and invasion.

Conflict of interest

The authors declare that they have competing interest to disclose regarding this work.

Author's contributions

EMe and EMa carried out most of the experiments and participated equally to the generation of the data. EMe participated in drafting the manuscript. ILM participated in the RhoA activation experiments and manuscript review. GF was strongly involved in data discussion and manuscript review. FD helped to analyze the results and coordinate the study. SDS conceived the study, coordinated the analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National du Cancer (INCa), Cancerpole Grand Sud-Ouest (GSO), INSERM, Institut Claudius Regaud and University of Toulouse. E. Meunier had a Ph.D. fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Thanks are due to P. Balaguer who kindly provided MELN cells, Emilie Boulioung for her precious help.

Figure legends

Figure 1: Effect of RhoA and RhoC down-regulation on ER α and HDAC1 recruitments on 4 promoters

After 24h of culture, MELN (A) and MCF-7 (B, C, D) were transfected with siRNA control (siC) or sequence *versus* RhoA (siA2) or RhoC (siC2) at 40 nM. 3 days later, cells were seeded without estrogen. After 3 days of estrogen deprivation, cells were treated with E₂ for 1 hour then lysed and sonicated. Chromatin immunoprecipitation (ChIp) was performed with ER α (A) or HDAC1 (B) antibody. ER α recruitment on ERE-luciferase, vitellogenin,

pS2, PR or cathepsin D promoters was quantified using quantitative PCR. Error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments.

Figure 2: Effect of RhoA and RhoC down-regulation on ERE-dependent luciferase activity, PR, cathepsin D and pS2 mRNA expressions

After 24h of culture, MELN (A) and MCF-7 (B, C, D) cells were transfected with control siRNA (siC) or 2 sequences *versus* RhoA (siA1, siA2) and RhoC (siC1, siC2) at the concentrations of 40 and 50 nM. After 3 days of estrogen deprivation, then 16h of estrogen stimulation or not, luciferase activity was measured (A) and PR (B), cathepsin D (C) and pS2 (D) expressions were quantified by qRT-PCR. Error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments.

Figure 3: Effect of RhoA and RhoC down-regulation on ER α expression

After 24h of culture, MCF-7 cells were transfected with control siRNA (siC) and 2 siRNA sequences *versus* RhoA (siA1 and siA2) at the concentration of 40 nM. After 3 days of estrogen deprivation then 16h of estrogen stimulation or not, ER α expression were evaluated by western Blot (A) and by qRT-PCR (B). (A) is representative of 2 to 4 independent experiments for RhoC and RhoA down-regulation respectively and in (B), error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments.

Figure 4: Estrogen effect on the activation of RhoA and ER α effect on RhoA expression

A: After 24h of culture and 3 days of estrogen deprivation, MCF-7 cells were treated with E₂ (50 nM) or EGF (50 ng/ml) during 30 minutes or 2 hours. Cells were then lysed and an immunoprecipitation of RhoA activated was performed with glutation-sepharose beads. RhoA-GTP and total RhoA were then evaluated by western blot using RhoA antibody.

B: After 24h of culture, then 3 days of deprivation, MCF-7 cells are treated with E₂ (50 nM) or ICI182,780 (10 μ M) during 30 or 120 minutes. RhoA-GTP and RhoA are then evaluated by western blot.

C: After 24h of culture, MCF-7 cells were transfected with siRNA control (siC) or sequence *versus* ER α (siER). 48h later, cells were lysed and ER α and RhoA expression were evaluated by western blot.

All results are representative of 3 independent experiments.

Figure 5: RhoA, B and C modulate ER α recruitment on its target genes, example of PR

A: The 3 Rho proteins modulate ER α recruitment on PR gene

B: Only RhoA and RhoB control ER α transcriptional activity on PR and ER α expression.

Description of additional data files

Additional Figure 1: Efficiency and specificity of RhoA and RhoC down-regulation

After 24h of culture, MCF-7 cells were transfected with control siRNA (siC) and 2 siRNA sequences *versus* RhoA (siA1 and siA2) or RhoC (siC1 and siC2) at the concentration of 40 nM. After 3 days of estrogen deprivation followed by 16h of E₂ stimulation, RhoA, RhoB and RhoC expressions were evaluated by qRT-PCR (A) and RhoA and RhoB expressions by western Blot (B).

In (A), error bars represent the mean values \pm SD from 3 independent experiments. (B) is representative of 3 independent experiments.

References

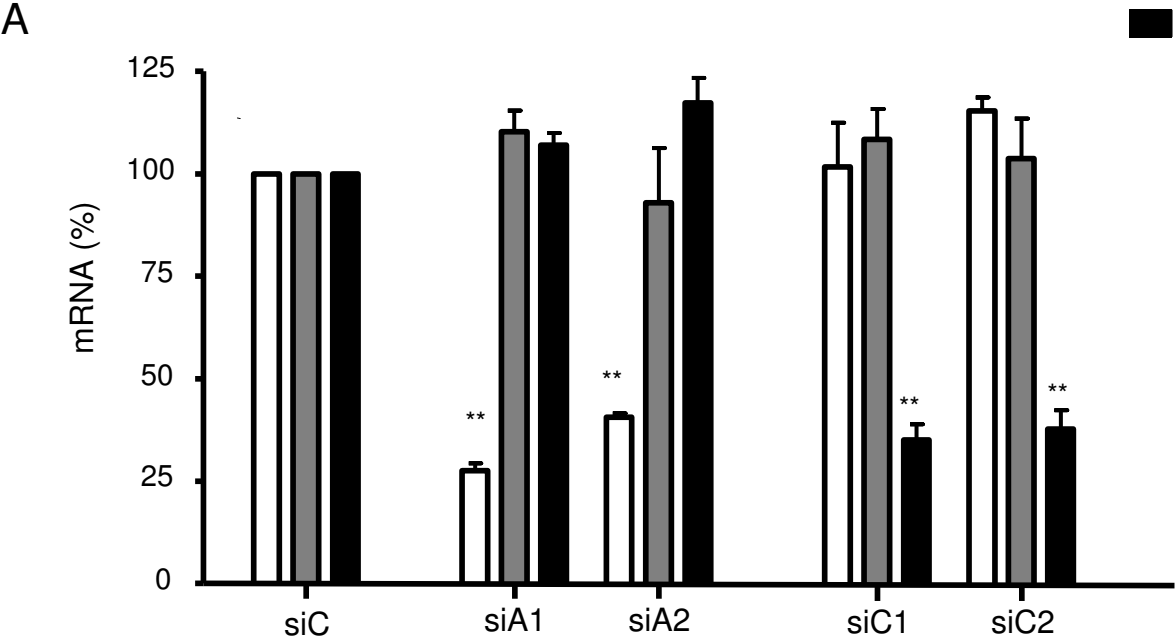
1. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(9):631-643.
2. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA: **Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways.** *Steroids* 2009, **74**(7):622-627.
3. Jaffe AB, Hall A: **Rho GTPases: biochemistry and biology.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, **21**:247-269.
4. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C: **Rho GTPase function in tumorigenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1796**(2):91-98.
5. Heasman SJ, Ridley AJ: **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(9):690-701.
6. Moscow JA, He R, Gnarr JR, Knutsen T, Weng Y, Zhao WP, Whang-Peng J, Linehan WM, Cowan KH: **Examination of human tumors for rhoA mutations.** *Oncogene* 1994, **9**(1):189-194.
7. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B: **Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters.** *Br J Cancer* 2002, **87**(6):635-644.
8. Rihet S, Vielh P, Camonis J, Goud B, Chevillard S, de Gunzburg J: **Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2001, **127**(12):733-738.
9. Lahoz A, Hall A: **DLC1: a significant GAP in the cancer genome.** *Genes Dev* 2008, **22**(13):1724-1730.
10. Wheeler AP, Ridley AJ: **Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility.** *Exp Cell Res* 2004, **301**(1):43-49.
11. Bellizzi A, Mangia A, Chiriatti A, Petroni S, Quaranta M, Schittulli F, Malfettone A, Cardone RA, Paradiso A, Reshkin SJ: **RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease.** *Int J Mol Med* 2008, **22**(1):25-31.
12. Tang Y, Olufemi L, Wang MT, Nie D: **Role of Rho GTPases in breast cancer.** *Front Biosci* 2008, **13**:759-776.
13. Jahner D, Hunter T: **The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**(7):3682-3690.
14. Zalzman G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian A, Olofsson B: **Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle.** *Oncogene* 1995, **10**(10):1935-1945.
15. Gampel A, Parker PJ, Mellor H: **Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB.** *Curr Biol* 1999, **9**(17):955-958.
16. Engel ME, Datta PK, Moses HL: **RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation.** *J Biol Chem* 1998, **273**(16):9921-9926.
17. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Munoz-Antonia T: **Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(7):2225-2232.

18. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G: **Loss of RhoB expression in human lung cancer progression.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(8):2742-2750.
19. Jiang WG, Watkins G, Lane J, Cunnick GH, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE: **Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(17):6432-6440.
20. Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I: **Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma.** *Lab Invest* 2003, **83**(6):861-870.
21. Faried A, Faried LS, Usman N, Kato H, Kuwano H: **Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2007, **14**(12):3593-3601.
22. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA: **A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.** *Cell* 2009, **137**(6):1032-1046.
23. Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY, Wu J, Nakayama KI, Kang HY, Huang HY *et al*: **Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis.** *Nat Cell Biol*, **12**(5):457-467.
24. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO: **Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC.** *Nature* 2000, **406**(6795):532-535.
25. van Golen KL: **Inflammatory breast cancer: relationship between growth factor signaling and motility in aggressive cancers.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**(3):174-179.
26. Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF, Merajver SD: **WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2004, **6**(2):R110-115.
27. Lo AC, Georgopoulos A, Kleer CG, Banerjee M, Omar S, Khaled H, Eissa S, Hablas A, Omar HG, Douglas JA *et al*: **Analysis of RhoC expression and lymphovascular emboli in inflammatory vs non-inflammatory breast cancers in Egyptian patients.** *Breast* 2009, **18**(1):55-59.
28. Wu M, Wu ZF, Rosenthal DT, Rhee EM, Merajver SD: **Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers.** *Cancer*, **116**(11 Suppl):2768-2782.
29. Turpin E, Bieche I, Bertheau P, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, Olivi M, Espie M, Marty M, Lidereau R *et al*: **Increased incidence of ERBB2 overexpression and TP53 mutation in inflammatory breast cancer.** *Oncogene* 2002, **21**(49):7593-7597.
30. Stebel A, Brachetti C, Kunkel M, Schmidt M, Fritz G: **Progression of breast tumors is accompanied by a decrease in expression of the Rho guanine exchange factor Tiam1.** *Oncol Rep* 2009, **21**(1):217-222.
31. Ronneburg H, Span PN, Kantelhardt E, Dittmer A, Schunke D, Holzhausen HJ, Sweep FC, Dittmer J: **Rho GDP dissociation inhibitor alpha expression correlates with the outcome of CMF treatment in invasive ductal breast cancer.** *Int J Oncol*, **36**(2):379-386.
32. Rubino D, Driggers P, Arbit D, Kemp L, Miller B, Coso O, Pagliai K, Gray K, Gutkind S, Segars J: **Characterization of Brx, a novel Dbl family member that modulates estrogen receptor action.** *Oncogene* 1998, **16**(19):2513-2526.
33. Su LF, Knoblauch R, Garabedian MJ: **Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response.** *J Biol Chem* 2001, **276**(5):3231-3237.

34. El Marzouk S, Schultz-Norton JR, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM: **Rho GDP dissociation inhibitor alpha interacts with estrogen receptor alpha and influences estrogen responsiveness.** *J Mol Endocrinol* 2007, **39**(4):249-259.
35. Harding MA, Theodorescu D: **RhoGDI signaling provides targets for cancer therapy.** *Eur J Cancer*, **46**(7):1252-1259.
36. Cestac P, Sarrabayrouse G, Medale-Giamarchi C, Rochaix P, Balaguer P, Favre G, Faye JC, Doisneau-Sixou S: **Prenylation inhibitors stimulate both estrogen receptor alpha transcriptional activity through AF-1 and AF-2 and estrogen receptor beta transcriptional activity.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(1):R60-70.
37. Balaguer P, Boussioux AM, Demirpence E, Nicolas JC: **Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands.** *Luminescence* 2001, **16**(2):153-158.
38. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E: **Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells.** *Cancer Res* 2006, **66**(1):482-489.
39. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F: **Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter.** *Cell* 2003, **115**(6):751-763.
40. Zhang H, Xie X, Zhu X, Zhu J, Hao C, Lu Q, Ding L, Liu Y, Zhou L, Huang C *et al*: **Stimulatory cross-talk between NFAT3 and estrogen receptor in breast cancer cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**(52):43188-43197.
41. Baron S, Escande A, Alberola G, Bystricky K, Balaguer P, Richard-Foy H: **Estrogen receptor alpha and the activating protein-1 complex cooperate during insulin-like growth factor-I-induced transcriptional activation of the pS2/TFF1 gene.** *J Biol Chem* 2007, **282**(16):11732-11741.
42. Han J, Li L, Hu J, Yu L, Zheng Y, Guo J, Zheng X, Yi P, Zhou Y: **Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through Rho A and Rho C activation.** *Endocrinology*, **151**(4):1732-1742.
43. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: **The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.** *Cell* 1992, **70**(3):401-410.

Additional Figure 1

□ RhoA
▒ RhoB
■ RhoC



B

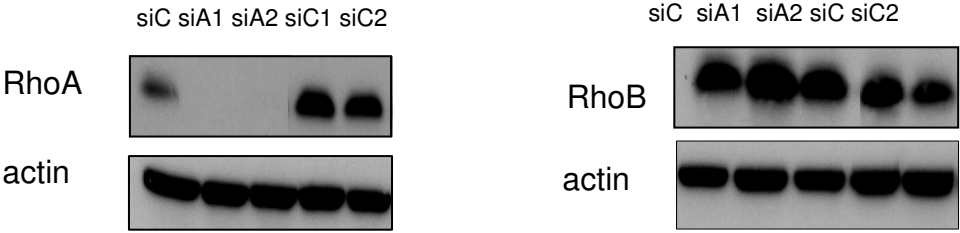


Figure 1

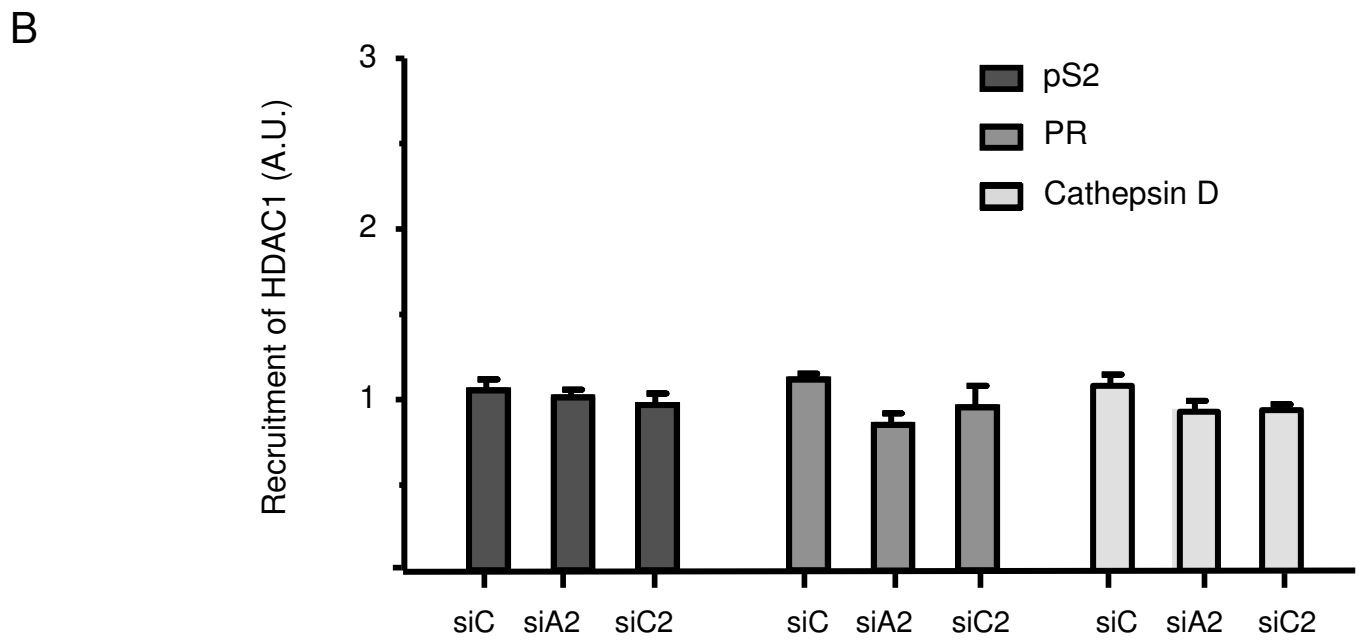
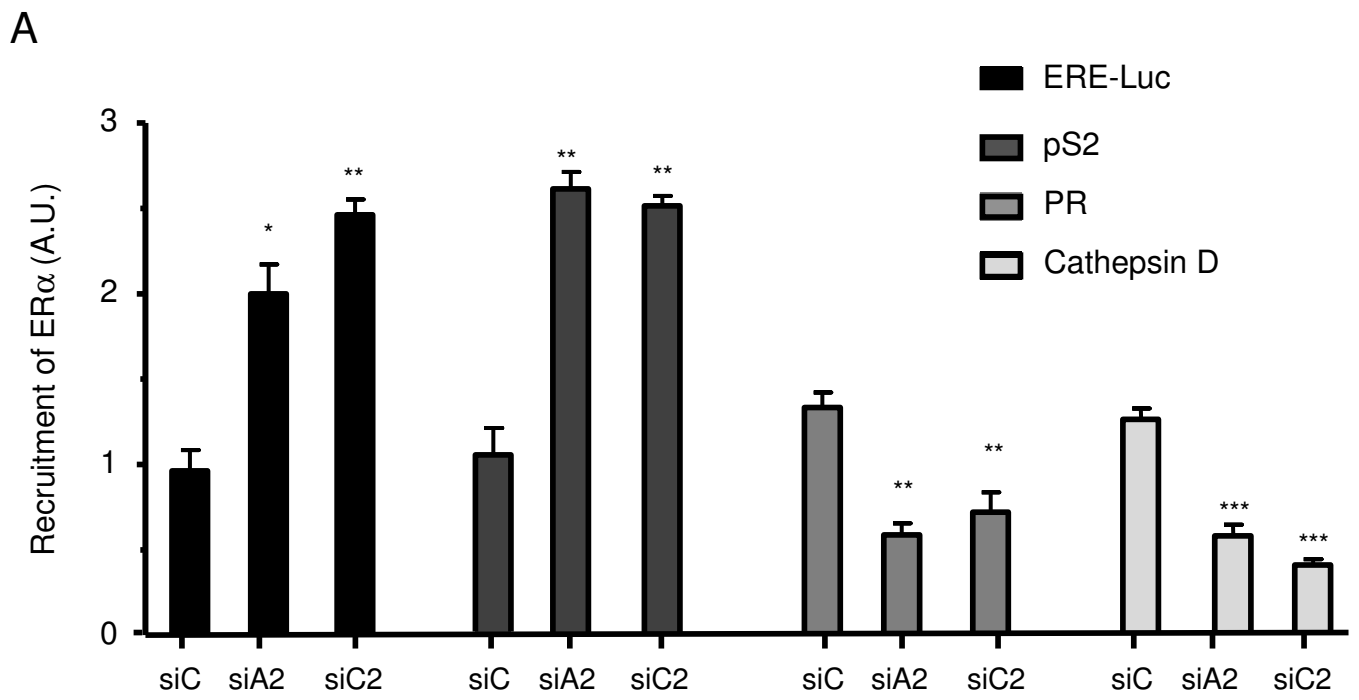


Figure 2

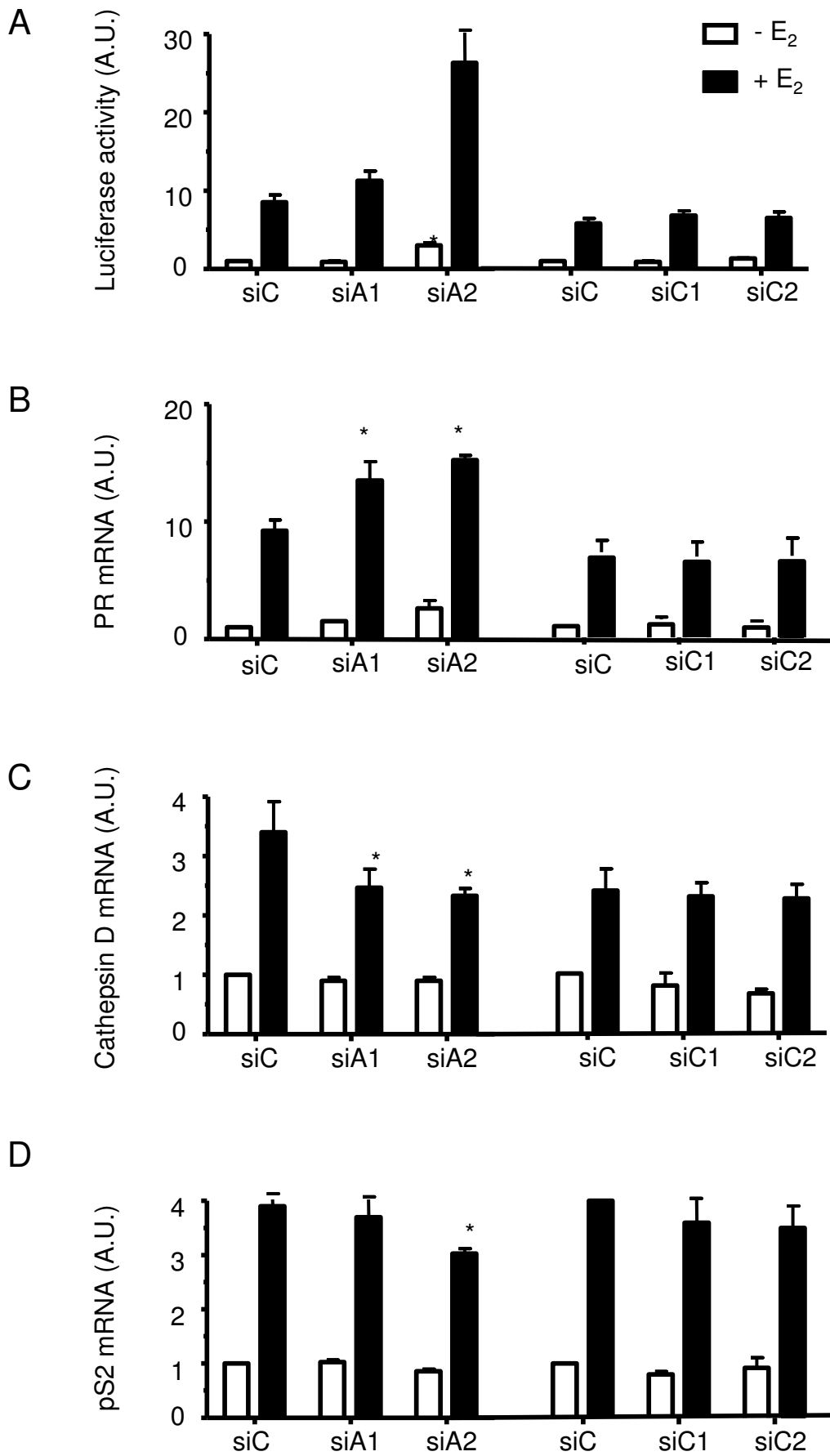


Figure 3

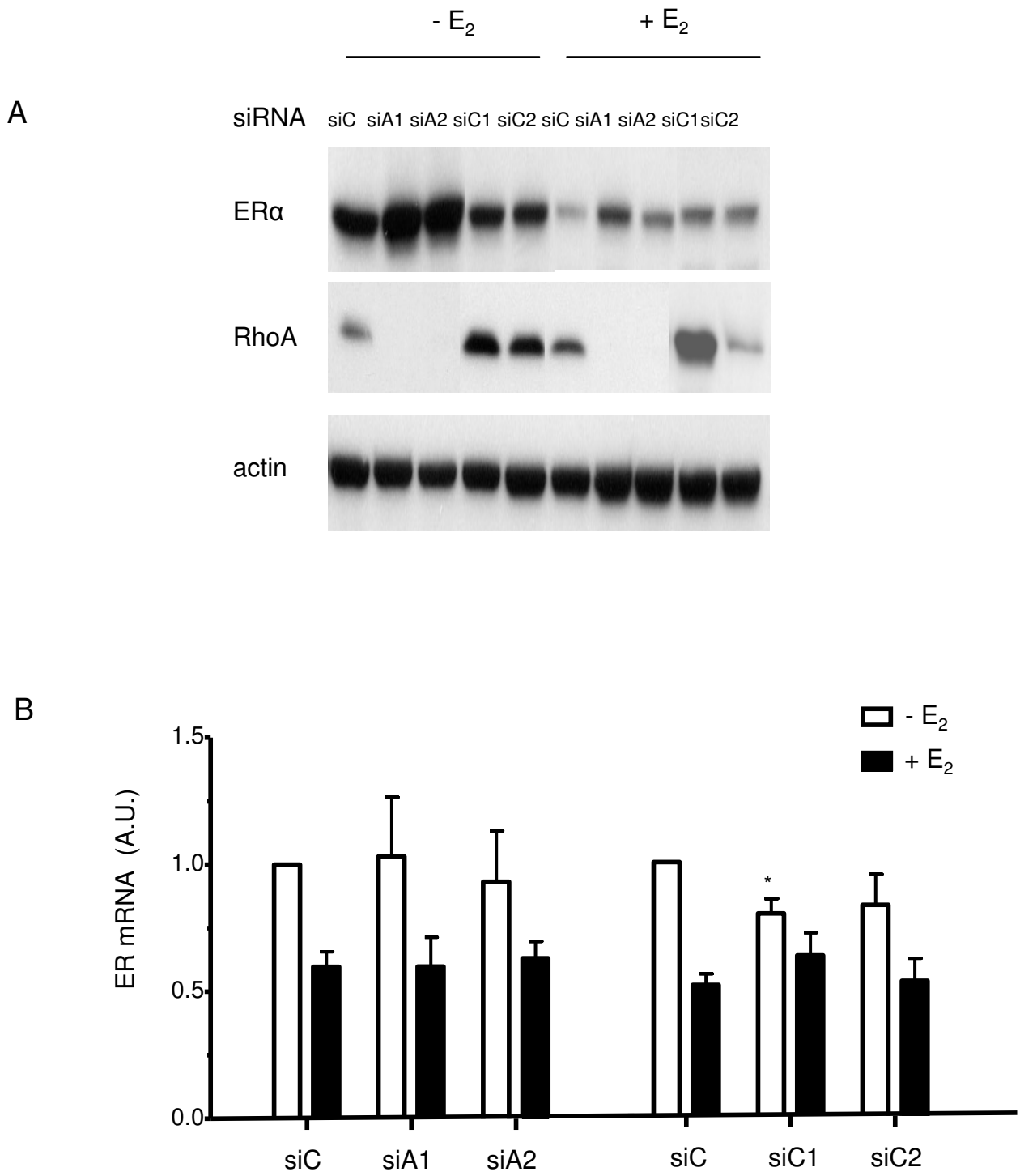


Figure 4

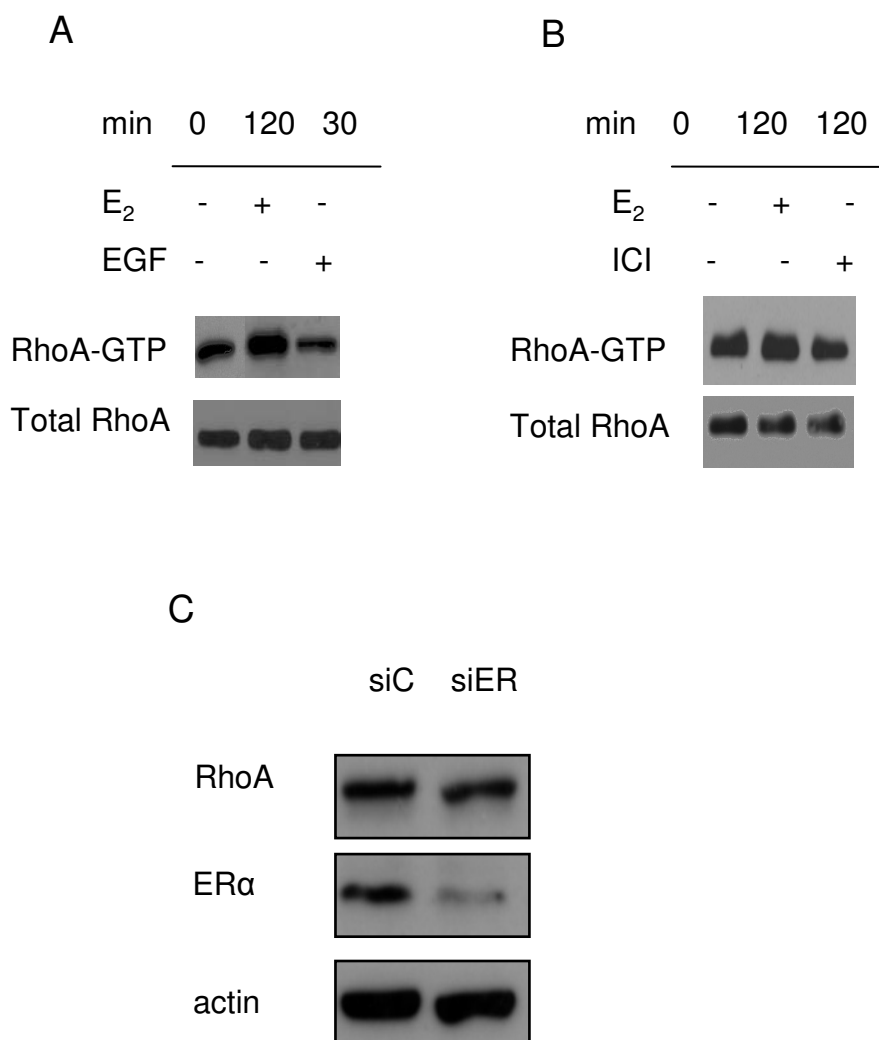
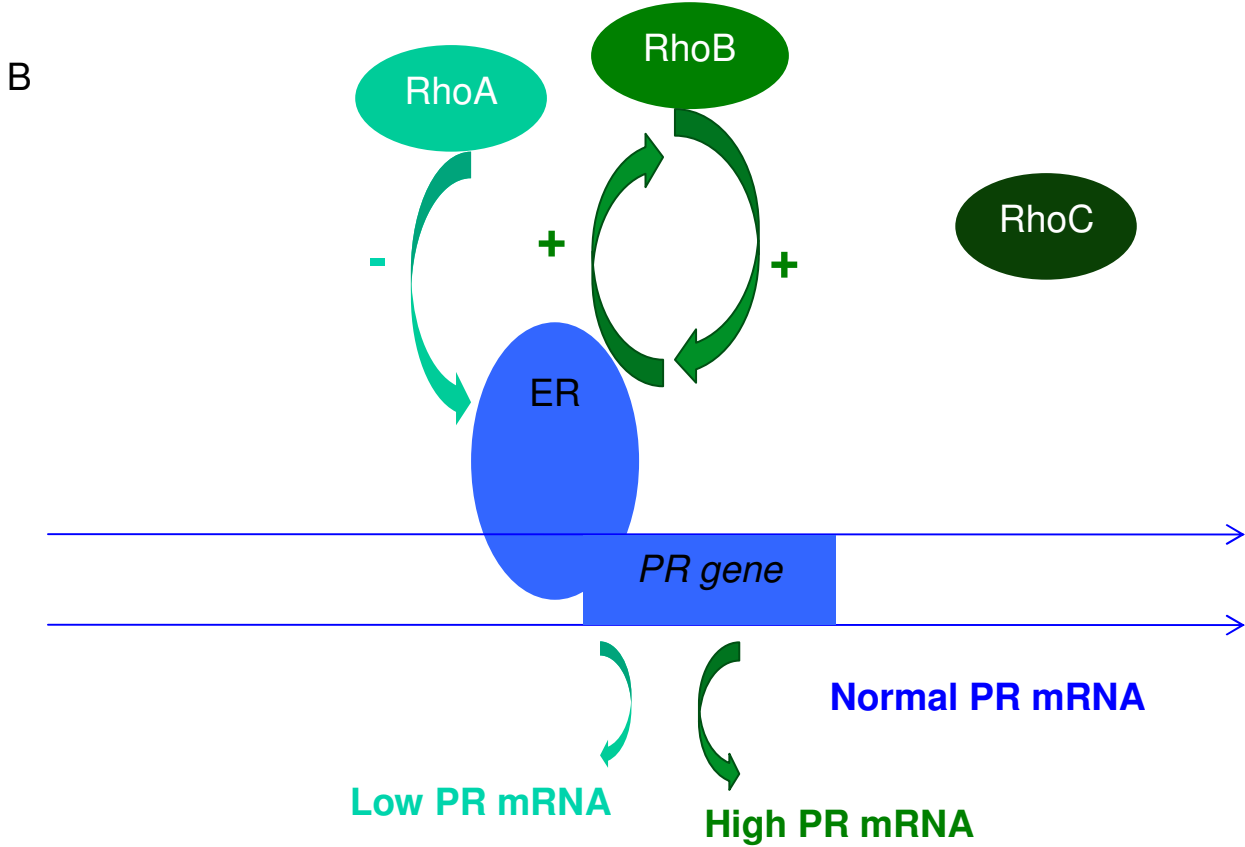
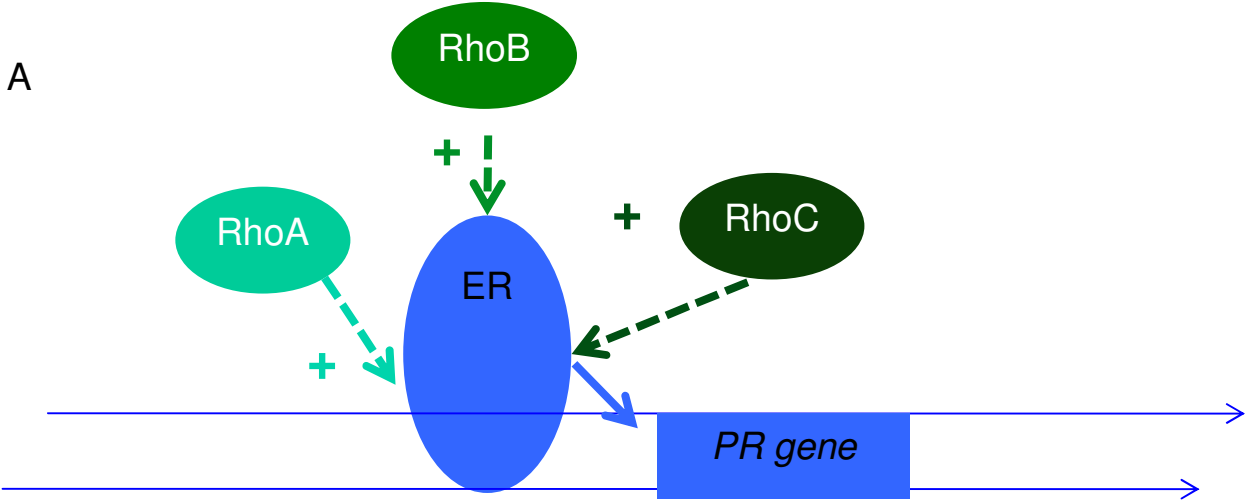


Figure 5



Discussion

Nos résultats montrent que dans les MCF-7, le recrutement du RE α sur le gène du *RP* est inhibé non seulement par l'extinction de RhoB mais également par celles de RhoA et RhoC. RhoA et RhoC contrôlent de la même façon le recrutement du RE α sur 3 autres de ses gènes cibles.

Nous démontrons également que RhoA régule négativement l'expression du gène du *RP* et positivement ceux de *pS2* et de la *cathepsine D*. Cette régulation n'est pas liée au recrutement du RE α sur le promoteur de ces gènes. Dans le cas spécifique du gène de la *cathepsine D*, la forte diminution du taux d'ARNm sous ARNi dirigé contre RhoA est bien associée à une diminution du recrutement du RE α sur son promoteur. Pour la vitellogénine, l'augmentation de l'activité luciférase dans les cellules MELN est à l'inverse associée à une diminution significative du recrutement du RE α . Contrairement à RhoA, la modulation du recrutement du RE α observée sous ARNi dirigé contre RhoC n'est associée à aucun contrôle de la transcription de ces gènes cibles du RE α . Ces résultats suggèrent que RhoA, et non RhoC, possède un rôle clé comme modulateur de la transcription dépendante du RE α dans les cellules MCF-7, indépendamment du recrutement de celui-ci.

Nous montrons dans un second temps que l'extinction de RhoA augmente l'expression du RE α , que ce soit en absence ou en présence d'E₂. Cet effet est opposé à celui obtenu lors de l'extinction de RhoB et surtout n'affecte pas le niveau d'expression de l'ARNm de RE α . En effet, sous ARNi dirigé contre RhoB, une diminution de l'expression du RE α est observée, à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine. Il apparaît donc que RhoA et RhoB régulent tout deux l'expression du RE α mais par des mécanismes différents. Dans le cas de RhoA, il est à déterminer à présent si elle module la stabilité du RE α en analysant la demi-vie et la dégradation par le protéasome lorsque RhoA est inhibé.

Dans la mesure où nous avons observé cette régulation à la fois en absence et en présence de E_2 , un dialogue spécifique actif en absence de toute stimulation œstrogénique semble donc exister entre RhoA et le RE α . Ce dialogue est renforcé lors d'une stimulation œstrogénique par l'activation rapide de RhoA lui-même vers sa forme liée au GTP et inversement par l'inhibition de l'expression du RE α par RhoA.

En ce qui concerne RhoC, il contrôle également l'expression du RE α , toujours au niveau post-transcriptionnel, mais seulement en présence de E_2 , confirmant un rôle physiologique encore différent dans la signalisation liée au RE α .

L'ensemble de ces résultats démontrent que, d'une part RhoA et RhoC modulent le recrutement du RE α sur ses gènes cibles, et que d'autre part, RhoA est un acteur majeur du contrôle de l'activité transcriptionnelle du RE α . En ce qui concerne le gène de *RP*, les 3 protéines Rho que nous avons étudiées modulent positivement le recrutement du RE α sur le promoteur de ce gène mais seulement RhoA et RhoB contrôlent l'activité transcriptionnelle du RE α sur l'expression du *RP* avec des effets opposés. Là encore, il apparaît que deux dialogues distincts existent entre le RE α et chacune des deux protéines RhoA et RhoB.

Un axe majeur à développer est à présent l'identification des rôles respectifs de RhoA et RhoB non seulement dans la signalisation du RE α mais également dans le déterminisme de l'agressivité d'une tumeur, le passage de l'état RE négatif à l'état RE positif et enfin dans l'acquisition des résistances aux traitements hormonaux.

III. RhoB contrôle l'expression de HDAC1 *in vitro* et *in vivo*

Introduction

Dans cette troisième partie du travail, nous avons étudié les relations entre RhoB et HDAC1. En effet, lors des travaux décrits précédemment, il nous est apparu que RhoB semblait réguler de façon majeure l'expression de HDAC1.

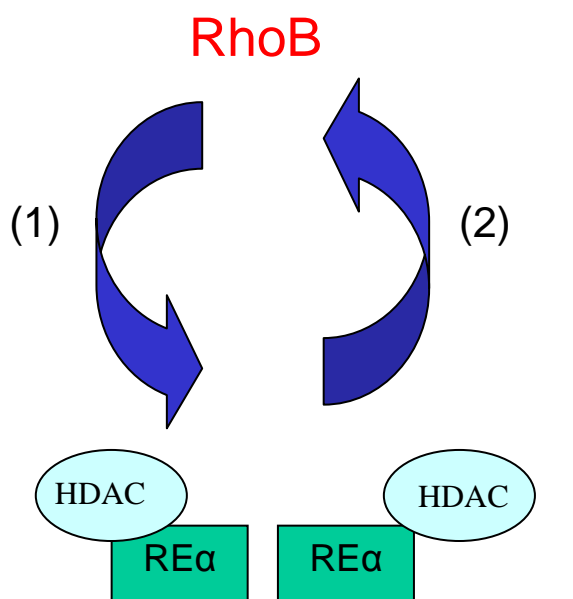
Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines Rho sont impliquées dans les cancers du sein. Les HDAC, éléments clés de la régulation transcriptionnelle, jouent également un rôle important dans les cancers dans les quels elles sont souvent surexprimées, en particulier dans les cancers mammaires. Nous avons décrits les travaux de Krusche qui montrent que les HDAC1 et HDAC3 sont présentes, au niveau nucléaire, dans respectivement 40 et 44% des cellules de cancers mammaires [11]. De plus, les expressions de ces deux HDAC dans des cellules de cancers du sein invasifs corrèlent avec l'expression des RH et celle de HDAC1 est un marqueur pronostic indépendant de bon pronostic, de survie sans récidence mais pas de survie globale.

Les inhibiteurs d'HDACs sont à l'étude pour être utilisés en particulier dans les cancers du sein n'exprimant pas les récepteurs hormonaux. Cette approche permet en effet, dans des modèles de cellules de cancers du sein RE négatives, de ré-exprimer le RE α afin de pouvoir traiter ensuite par un anti-œstrogène, le tamoxifène par exemple [11]. Comme nous l'avons vu dans la revue bibliographique, les associations d'inhibiteurs de HDAC et d'ADN MéthylTransférases sont également développées [337, 338]. Dans des cellules RE positives, des inhibiteurs d'HDAC, tels que la TSA, répriment l'expression du RE α permettant d'envisager dans ce cas un rôle inhibiteur de prolifération plus direct de ces molécules [326, 327, 328, 329].

Concernant les protéines Rho, des données suggèrent une relation entre RhoB et HDAC1. Il a en effet été montré que RhoB est surexprimé après un traitement par la trapoxine A (inhibiteur

d'HDAC) et inhibé par HDAC1. De plus, un traitement de cellules cancéreuses avec des FTIs ou des GGTIs aboutit à la dissociation de HDAC1 et l'association de HAT sur le promoteur de RhoB [11]. Au sein du laboratoire, il a été montré sur des cellules cancéreuses pulmonaires que la TSA induit une ré-expression de RhoB [11].

Considérant l'ensemble de ces données et nos observations préliminaires, cette étude a eu pour but de déterminer l'implication de RhoB dans les cancers du sein hormonodépendants et de caractériser un éventuel dialogue entre RhoB et HDAC1.



Les différents axes abordés

- (1) Effet de RhoB sur HDAC1 :
expression/localisation**
- (2) Effet de HDAC1 sur RhoB :
expression/ activation**

RhoB controls HDAC1 expression in breast cancer cells

Elise Meunier^{1,2,3}, Emilie Malissein^{1,2}, Bettina Couderc^{1,3,4}, Yann Bergé^{1,2}, Thomas Filleron¹,
Georges C. Prendergast⁵, Gilles Favre^{1,2,3}, Florence Dalenc^{1,2}, Sophie F. Doisneau-Sixou^{1,2,3}

¹- Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31300, France

²- INSERM U563, Toulouse, F-31300, France

³- Université de Toulouse, Toulouse, F-31300, France

⁴- EA3035, Toulouse, F-31300, France

⁵- Lankenau Institute for Medical Research, Wynnewood, PA, USA

Acknowledgements

This work was supported by the Institut National du Cancer (INCa), Canceropole Grand Sud-Ouest (GSO), INSERM, Institut Claudius Regaud and University of Toulouse. E. Meunier had a Ph.D. fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Thanks are due to C. Silvagni, F. Lenfant, E. Bousquet, and A. Peyret for their precious help.

Corresponding authors

Sophie Doisneau-Sixou and Gilles Favre

Institut Claudius Regaud, 20-24 rue du pont St Pierre, 31052 Toulouse France

Tel +33 (0)5 61 42 42 23

Fax : +33 (0)5 61 42 46 31

E-mail : doisneau-sixou.sophie@claudiusregaud.fr and favre.gilles@claudiusregaud.fr

Running head

RhoB controls HDAC1 in breast cancer cells

Key words

RhoB / HDAC1 / Estrogen receptor / breast cancer

Abstract

Introduction:

RhoB has been reported to exert positive and negative effects on cancer pathophysiology but an understanding of its role in human cancers, including breast cancers, remains incomplete. We recently demonstrated that RhoB promotes the expression of ER α in a manner correlated with cell proliferation in ER positive breast cancers (data submitted) and investigated then a possible cross-talk with HDAC1, a major ER α corepressor.

Methods:

Protein and mRNA levels of HDAC1 were analyzed *in vitro* and *in vivo*, according to the expression of RhoB. We used siRNA sequences to specifically down-regulate RhoB expressions in ER α positive breast adenocarcinoma MCF-7 cells and adenoviral constructs to overexpress it. Results were confirmed in 3 other breast cancer cell lines both ER positive and negative and *in vivo* using RhoB deficient mice. In parallel, we down-regulated HDAC1 expression using siRNA sequences to study a potential control on RhoB expression. We then analyzed the effects of RhoB down-regulation on HDAC1 recruitment on 4 ER α target genes.

Results:

Our data strongly suggest that RhoB, besides stimulating the expression of ER α , positively controls at transcriptional and post-transcriptional levels, the expression of HDAC1 and modulates its recruitment to the promoter of ER α target genes. The modulation of HDAC1 expression by RhoB is independent of the ER status. We could evidence a crosstalk as HDAC1 itself exerts a positive control on RhoB expression.

Conclusions:

We then documented a crosstalk between RhoB and HDAC1, with a reciprocal positive effect on their expression. The involvement in ER α signaling and the relevance of such crosstalk have to be investigated further in breast cancers.

Introduction

Prenylated proteins such as Rho small GTPases are key elements in crosstalk and integration of growth factor signal transduction pathways. Indeed, a variety of growth factors present in the tumor microenvironment activate Rho proteins [1], especially RhoB [2-4]. Like other Rho family proteins, RhoB cycles between GTP- (active) and GDP (inactive)-bound states, forming interactions with a variety of regulators and effectors that modulate activity and influence important processes in cancer, including neoplastic transformation, survival, invasion, and metastasis [5]. Rho GTPases, including RhoA, RhoB, and RhoC, have been implicated in the control of several critical cellular functions, including regulation of the actin cytoskeleton, cell proliferation and oncogenesis [6]. RhoB rapidly appeared as an immediate early response gene [2, 7-9]. In contrast to its relatives RhoA and RhoC, RhoB has been shown to play a negative role in oncogenesis in mice, where it has been shown to function as a tumor suppressor gene on the basis of investigations of genetically RhoB-deficient strains [10]. Similarly, tumor suppressive functions of RhoB have been documented in human cancer cells [11]. Unlike most of the small GTPases, RhoB has a short half-life [11] and is an immediate early response gene that is induced by a variety of stimuli, including growth factors EGF, PDGF, TGF β [2, 7-9, 12] or DNA-damaging agents [13, 14]. In response to cellular stress, RhoB appears to play a regulatory role in sensing the level of damage in cells and quickly triggering either subsequent protective responses [14-16] or cell death induction [10, 17, 18].

Although no constitutively active mutants of Rho GTPases have been detected in human tumors [19-21] and reviewed in [22] and [5], a correlation has been demonstrated between Rho protein overexpression and poor clinical outcome in breast cancers [23]. Specific RhoB overexpression has been correlated to disease progression [24] and we recently documented a feed-forward loop between RhoB and Estrogen Receptor (ER) alpha. Our results suggest that the role of RhoB in tumorigenesis involves a dual effect depending on the cellular context, with a potential pro-

oncogenic function in hormone dependant breast cancer cells (data submitted). ER α transcriptional effects are not only determined by ligands as estradiol, but also by crosstalk between ER α and growth factor signaling [25], always resulting in the dynamic and transient formation of cofactors complexes, on each considered target gene.

ER α cofactors include coactivators (p160 family with SRC-1 and SRC-3, CBP/P300/pCAF, ...) and corepressors (NcoR, SMRT). In those transcriptional complexes, acetylation and deacetylation of the ϵ -amino group of Lys residue are key reversible reactions. They are catalysed by the opposing actions of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetyltransferase (HDAC) respectively. HDACs have been correlated with a repression of gene transcription and extensively studied as therapeutic targets, in particular in the context of cancers. HDAC1 is one of the class I of HDAC, which are homologous to the yeast histone deacetylases Rpd3 and Hda1. Analyzing invasive breast carcinoma, Krusche *et al* detected HDAC1 protein expression in the nucleus of mammary luminal epithelial cells but not in basal cells and observed the presence of nuclear HDAC1 and HDAC3 proteins in 40 and 44% of breast tumors respectively [26]. They also found that HDAC1 level correlated significantly with estrogen and progesterone receptors expression and that HDAC1 was an independent prognostic marker of better disease free survival (DFS) but not overall survival (OS) in patients with invasive breast carcinoma [26]. Similarly, Zhang *et al* analyzed HDAC1 mRNA levels in invasive breast tumors and showed that HDAC1 mRNA levels were elevated in ER and PR positive tumors [27]. They also found that patients with breast tumors displaying high levels of HDAC1 mRNA levels tended to have a better prognosis; however, in this study, HDAC1 was not found to be independent prognostic marker of either DFS or OS. Several HDAC inhibitors are in clinical trials in breast cancers. The combination for example of TSA and AZA, a DNMT inhibitor, restored sensitivity to tamoxifen in MDA-MB 235 human breast cell lines and in nude mice. This effect was due to the re-expression of a functional ER α and the level of tamoxifen growth suppression paralleled that of ER α re-expression [28].

Some studies have shown a link between HDAC1 and RhoB. RhoB was found to be significantly upregulated by trapoxin A, an HDAC inhibitor and repressed by HDAC1 [29]. Moreover, treatment with prenylation inhibitors (FTIs and GGTIs) of cancer cells results in HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter [29]. In our laboratory, it was shown that a HDAC inhibitor (TSA) induces a significant RhoB re-expression in lung cancer cell lines whereas only a slight effect was observed with a méthyltransférase inhibitor (5-azacytidine) [30].

Thus, an important goal of the present study was to determine the involvement of RhoB in hormone-dependent breast cancers and to investigate hypothesized cross talks between RhoB and HDAC1 signaling.

Materials and Methods

Cell culture and reagents

The human breast adenocarcinoma cell lines MCF-7, T47D, SK-BR-3 and MDA-MB-231 were obtained from the American Tissue Culture Collection. Cells were grown routinely in Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM, *Lonza*), supplemented with 5% fetal bovin serum (FBS, *Pan*). Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were grown in DMEM with 10% FBS. Cells were treated with E₂ (*Sigma*) as indicated.

SiRNA transfection

Transient transfection of siRNA (40 nM) was performed using Oligofectamine[®] according to the manufacturer's instructions in OptiMEM (*Invitrogen*). The siRNA sequences of the oligonucleotide duplexes (*Eurogentec*) were siB1 (5'-CCGUCUUCGAGAACUAUGU-dTdT-3') and siB2 (5'-UGAUAUCCCUUGUCUGUAA-dTdT-3'), specific for 2 independent coding regions of *RhoB*, siA2 (5'GCAGGUAGAGUUGGCUUUG-dTdT3') for a coding region of *RhoA*, siER (5'-GGGAGAAUGUUGAAACACA-dTdT3'), specific for a coding region of *ERα*, siHDAC1 (sc-29343) specific for a coding region of HDAC1 (*Santa Cruz Biotechnology*) and the non-specific sequence siControl (siC), (5'-GACGUGGGACUGAAGGGGU-dTdT-3'). When indicated, cells were deprived of E₂, 3 days after transfection, by growing them in phenol red-free medium containing 5% DCC-FBS for 3 additional days, and then by treating them with E₂ or ethanol for the indicated times.

Adenoviral constructs expressing RhoB and transduction protocol

Replication-defective (Δ E1, E3) adenoviral (Ad) vectors expressing RhoB under the transcriptional control of the CMV promoter were constructed with the Adeasy System (*Qbiogen*) as described previously [31]. 500,000 MCF-7 cells were plated 24h prior to transduction with adenoviral vectors (control empty vector, AdC, or expressing RhoB, AdB) at a multiplicity of infection (MOI) of 100:1.

Western Blot analysis of human cell lines

Cells were lysed into lysis buffer as already described [12]. Cell extracts were separated by SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes (*Amersham*). Proteins were visualized using the enhanced detection system (*Amersham*) and the following antibodies against RhoB (sc-180), ER α (sc-543), HDAC1 (sc-7872), SRC-1 (sc-6996), SRC-3 (sc-7216) from *Santa Cruz Biotechnology*, PR (PgR636 clone) from *Dako*, β actin (MAB1501) from *Chemicon*, and the secondary antibodies antimouse (MP21120) and antirabbit (MP23145) horseradish peroxidase from *Interchim*. Protein abundance was quantified by densitometric phosphoimager analysis (*GE healthcare*). Relative band intensities were quantified by densitometric analysis.

Quantitative Reverse Transcribed PCR (qRT-PCR) in MCF-7 cells

Total RNA was isolated 16h after stimulation by E₂, using RNeasy kit according to the manufacturer's instructions (*Qiagen*), then reverse-transcribed using iScriptTMcDNA Synthesis Kit (*Biorad*). Quantitative PCR was performed with an iQreal-time PCR detection system (*Biorad*) using iQTM SYBR[®] Green Supermix (*Biorad*). The primer pairs used were: for GAPDH, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' and 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'; for 28s 5'-TCGCTGGGTCTTGGATGTC-3' and 5'-AGCAGATTGTGACAGACCATTC-3'; for ER α 5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3' and 5'-GGT CTTTTCGTATCCCACCTTTC-3'; for RhoB

5'-GTGCCTGTCGATCGTGTTTC-3' and 5'-GCGGTCGTAGTCCTCCTG-3'; for HDAC1
5'-TGCGGCAGCATTCTAAGGTT-3' and 5'-CAAGCTCCACATCAGTCCTTCC-
3' (*Eurogentec*).

Analysis of MEF generated and uteri collected from RhoB ^{-/-} mice

Homozygous (^{-/-}) and heterozygous (^{+/-}) mutant strains of RhoB deficient mice [10] were housed in polycarbonate cages in a room with controlled temperature and humidity where food and water were provided *ad libitum*. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were generated and grown in cell culture facilities [10]. They were then lysed as described above [12]. 6 week-old mice uteri were collected and lysed in Bunone buffer [32]. Protein and total RNA were then extracted and analyzed as described in the above paragraphs with specific murine antibodies and primers. Antibody against murine ER α was used (sc-542) from *Santa Cruz Biotechnology*. The following primer pairs were used: 5'-TCATGGAGTCTGCCAAGGA-3' and 5'-AGCCAGAGGCATAGTCATTGC-3' for murine ER α ; 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3' and 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' for murine GAPDH; 5'-GTGCCTGCTGATCGTGATCGTGTTTC-3' and 5'-GCGGTCGTAGTCCTCCTG-3'; for murine RhoB; 5'-TGCGGCAGCATTCTAAGGTT-3' and 5'-CAAGTCCCACAGTCCTTCC-3' for murine HDAC1.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIp) Assay

ChIp assays were performed with modifications of the procedure of Metivier [33], as described. Briefly, 10⁶ cells were synchronized by 3 days of culture in DMEM 5% DCC-FCS and then treated during 1h with E₂ (50 nM) or ethanol (control). Antibody used for the immunoprecipitation was HDAC1 (sc-6299) from *Santa Cruz biotechnology*.

Quantitative PCR were performed on an iCycler (*Biorad*) using the following primers (*Eurogentec*): 5'-CCACCAACCAGTGCACCATT-3' and 5'-GGT CTTTTCGTATCCCACCTTTC- 3' for ER α ; 5'- GGC AGG CTC TGT TTG CTT AAA GAG CG -3' to amplify the fragment of the human pS2; 5'-TCTCCTCCCTCTGCCCCTATATTC-3' to amplify the fragment of the human PR promoter flanking the + 745 AP-1 DNA binding motif where ER α is known to bind; 5'- CTCAGGTAGAAGGAGAAGATG-3' and 5'-CTGGGCGGTGTCAAAGTG-3' to amplify the fragment of the human cathepsin D; 5'- GGC CAT CTC TCA CTA TGA ATC ACT TCT GC -3' and 5'- GGC AGG CTC TGT TTG CTT AAA GAG CG -3' for cyclinD1 5'-GGCGACACAGCAGTGGGGAT-3' and 5'-TCTCCTCCCTCTGCCCCTATATTC-3' for c-myc. For the purifications of inputs, 20 μ l of extract were removed and heated at 65°C, DNA was then purified as for the immunoprecipitates, and was quantified by quantitative PCR as described below. The specificity of the immunoprecipitation of ER α was controlled by the use of rabbit IgG instead of the polyclonal anti-ER α antibody (Data not shown).

Cell growth determination

48h hours after siRNA transfection or transduction, cells were seeded at a density of 1,500 cells per well in 6-well plates in DMEM 5% FBS with ethanol (control) or E₂ (50 nM) and counted daily during the next 4 days with a coulter counter (*Beckman Coulter*). A Kruskal Wallis test was performed and the significance threshold was determined at 0.0125 using Bonferroni correction.

Statistical analysis

Student's *t* test was performed to compare the means of values from different experiments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) and $p < 0.001$ (***).

Results

RhoB strongly controls HDAC1 expression at both the protein and mRNA levels

As a first approach, we analyzed the effect of the extinction of two key Rho proteins, RhoA and RhoB on the expression of three major transcriptional cofactors : on the one hand, the coactivators SRC-1 and SRC-3 and on the other hand the corepressor HDAC1. Only RhoB extinction decreased HDAC1 whereas SRC-1 and SRC-3 were not modified and RhoA extinction had no effect (Supplemental Figure1). This dramatic decrease was observed both in the absence and presence of estradiol (E₂). In Figure 1A, we then characterized this inhibition by using a second siRNA sequence *versus* a coding region of RhoB (respectively 90% and 78% for siB1 and siB2). Performing immunocytochemistry (Figure 1B), we first had an expected nuclear localization of HDAC1 within MCF-7 cells treated by siC. We confirmed again the major decrease of HDAC1 level associated to RhoB depletion, but with no obvious change of the subcellular localization.

We then demonstrated that RhoB down-regulation decreases HDAC1 expression at both the protein and mRNA levels (Figure 1C) as the two siB sequences induced 60 to 75% of the control expression. According to the experiments, higher levels of mRNA inhibition could be reached (cf Figure 4B) but were not constant. Nonetheless, this clear inhibition of HDAC1 mRNA cannot totally support the dramatic decrease observed at the protein level. Besides, RhoB overexpression significantly increased the expression of HDAC1 and of ER α as we recently submitted (Figure 1D).

RhoB deficient mice exhibit a dramatically decreased expression of HDAC1

We also confirmed the involvement of RhoB in the control of HDAC1 expression *in vivo* using mice that are genetically deficient in RhoB (Figure 2). A major decrease of HDAC1 expression was visualized in mouse embryo fibroblasts (MEFs) collected from RhoB^{+/-} mice with an even

more dramatic decrease in MEFs collected from RhoB^{-/-} mice (Figure 2A). In the uterus (Figure 2B), a similar effect of RhoB down-regulation was observed, but to a lesser extent, as HDAC1 expression could still be detected both in RhoB ^{+/-} and RhoB^{-/-} mice. A comparison of mRNA levels expressed in uteri from wild-type, heterozygote and homozygote mice confirmed a parallel decrease in RhoB, ER α and HDAC1 mRNA expressions (Figure 2C). Altogether, these results extended the support for a hypothesized regulatory relationship between RhoB and HDAC1.

As we recently generated data showing that RhoB extinction decrease the proliferation of MCF-7 cells (data submitted), we analyzed the effect of HDAC1 extinction. Even a 64% down-regulation of HDAC1 had no effect on MCF-7 proliferation during 4 days (Supplemental Figure 2).

RhoB control on HDAC1 expression is partially regulated by the proteasome

As we evidenced a differential effect of RhoB down-regulation on the mRNA and the protein levels of HDAC1 in MCF-7 cells, we hypothesized a potential control of HDAC1 protein stability by RhoB. Therefore, we associated a proteasome inhibitor treatment, the MG132, to RhoB down-regulation, in the presence of E₂ (Figure 3).

Regarding RhoB, that has a short half-life time, the MG132 did increase its expression but slightly in the presence of siC (10%), whereas siB2 down-regulation was efficient both in the absence and presence of MG132 (80% down-regulation).

Regarding HDAC1, that has a similar short half-life time, the MG132 treatment also slightly increased its expression in the presence of siC (25%). A 60% decrease was observed in the presence of siB2 and with the treatment with MG132, a partial rescue was observed with only a 25% decrease. This result suggests that RhoB controls partially HDAC1 expression *via* the proteasomal degradation. This should be clearly confirmed by measuring and comparing the half-life times of HDAC1 when RhoB is down-regulated or not.

RhoB controls HDAC1 expression in breast cancer cell lines, independently of their ER α status

We extended the study of RhoB down-regulation on HDAC1 expression to additional breast cancer cell lines (Figure 4A). We used MCF-7 and T47D cells as ER positive cell lines and MDA-MB-231 and SKBR3 as ER negative cell lines. As already described, RhoB extinction down-regulates ER α expression in MCF-7 and in T47D (data submitted). Besides, we confirmed a decrease of HDAC1 expression with RhoB depletion not only in MCF-7 cells but in the T47D cells (model of hormone-dependent cells) and in SKBR3, MDA-231 cells (models of non hormone-dependent cells).

HDAC1 down-regulation decreases RhoB expression at both the protein and mRNA levels

Besides this control exerted by RhoB on HDAC1 expression, we wanted to investigate further the potentiality of a reciprocal regulation of HDAC1 on RhoB expression. In Figure 4A, we used siRNA *versus* HDAC1 and showed variable but significant decreases of RhoB expression in MCF-7, T47D, MDA-MB-231 and SK-BR3 cells (65, 55, 48 and 45 % respectively). The depletion of HDAC1 has no significant consequence on ER α expression in the two ER positive cell lines. In Figure 4B, we observed that HDAC1 depletion induces a 80% decrease of RhoB mRNA in MCF-7 cells. The slight increase of ER α mRNA in the presence of siHDAC1 ($p < 0.05$) does not appear to have any consequence on ER α protein level. These results clearly demonstrate a cross-regulation between HDAC1 and RhoB.

RhoB down-regulation controls HDAC1 recruitment on some ER α target genes

We hypothesized that the ability of RhoB to modulate HDAC1 expression could impair the major transcriptional functions of ER α , HDAC1 being a major corepressor of ER α .

We used ChIp analysis to study the effect of RhoB down-regulation on the recruitment of HDAC1 onto *ERα*, *pS2*, *PR*, *cathepsin D*, *cyclin D* and *c-myc* genes promoters at early times, *i.e.* at 1h after E₂ stimulation (Figure 5). The efficiency of the immunoprecipitation was at least 80% (data not shown) and its specificity was controlled by the use of nonspecific rabbit IgG in place of the specific antibodies. Controls never exceeded 15% of the signals obtained with HDAC1 antibody. Following siB1 transfection, the recruitment of HDAC1 to the *pS2* gene promoter dramatically decreased (rate 0.4 ± 0.05 compared to siC). The recruitment of HDAC1 on *PR* gene increase with the depletion of RhoB *versus* siRNA control (1.67 ± 0.35 rate). Besides, the recruitment did not significantly changed neither on *ERα*, *cathepsin D*, *cyclin D1* nor *c-myc* promoters.

These results showed that the decrease of HDAC1 expression under RhoB depletion does not regulate the recruitment of HDAC1 on various targets genes of ERα. Nonetheless, RhoB down-regulation does modify significantly the recruitment of HDAC1 on some specific genes.

Discussion

Although the tumor suppressor function of RhoB has been documented in many human cancers [11, 34], RhoB overexpression was suggested to be associated with tumor progression in breast cancers. The mechanism of this apparent antagonism of RhoB function in oncogenesis remains to be elucidated. We have shown here a positive cross-talk between RhoB and HDAC1 that does not rely on ER α expression.

The mechanism of this effect is far from being elucidated, but a direct interaction of RhoB with the ER α dependant transcriptional machinery should not be excluded since a direct interaction between ER α and RhoGDI α in breast cancer cells has been demonstrated [35] and we have shown here a strong nuclear localization of RhoB in ER α positive tumor tissues.

Our data bring together lines of evidence to support this cross-talk. Firstly, cellular results demonstrated that the level of RhoB controls the expression of HDAC1 in ER α positive and negative breast cancer cell lines. In MCF-7 cells, RhoB has the same effect both in the absence and presence of E₂ outlining the potential physiological consequences, independently of the estrogenic impregnation. This effect is less dramatic at the mRNA level than at the protein level. Preliminary experiments suggest that RhoB could regulate HDAC1 at a post-transcriptional level, especially *via* a control of the proteasomal degradation of HDAC1. This has to be confirmed by analyzing the role of RhoB on HDAC1 half-life time. Besides, microRNA which regulates mRNA could be keys regulators of this regulation [36].

We also clearly demonstrated *in vivo* the control of RhoB on HDAC1 expression in uterus, an estrogen dependant tissue, and in MEF cells, from a RhoB^{-/-} mouse model. MEF cells do express ER α but with a lower physiological relevance. In uteri, we observed a better correlation between HDAC1 mRNA and protein down-regulations, with a complete absence of HDAC1 visualization in the blots of RHoB^{-/-} mice. This observation does not exclude the possibility of additional post-

transcriptional regulations we suggested above, but highlights the strong impact of RhoB on HDAC1 expression *in vivo*. A physical interaction between RhoB and HDAC1 may happen as a nuclear localization of RhoB has been already described (data submitted).

In parallel, we generated data to demonstrate that HDAC1 positively regulates RhoB expression, again both at the mRNA and protein levels, suggesting a strong positive feed-back loop. HDAC1 being a major corepressor not only of ER α , we demonstrated that RhoB can control the recruitment of HDAC1 on some genes whose activation is ER α -dependant. Strikingly, the decreased level of HDAC1 under RhoB depletion could lead to either a decrease, an increase or no effect on HDAC1 recruitment on various genes. The potential consequences of HDAC1 down-regulation and impaired recruitments under RhoB influence have to be investigated further.

It must be outlined that the closely related protein RhoA had no effect on HDAC1 expression and that RhoB down-regulation did not impair SRC-1 and SRC-3 coactivators. The physiological relevance of such a strong reciprocal control has to be deciphered in breast cancers and in other tissues. Nonetheless, a major issue is to define now the potential cross talks existing between RhoB and other HDAC of class I, and eventually of other classes. Indeed, numerous inhibitors of HDAC are now developed [28]and may interfere with RhoB functions either as tumor suppressor or pro-proliferative agent [30]and data submitted. Although HDAC1 inhibition did not alter the proliferation of MCF-7 cells, a complete extinction of HDAC1 may have to be analysed in various cell lines.

In conclusion, RhoB appears to be a key inducer of HDAC1 and inversely. Our new findings shed light on the potential role of RhoB in tumorigenesis involving an effect on a major corepressor, HDAC1.

Conflict of interest

The authors declare that they have competing interest to disclose regarding this work.

Author's contributions

EMe carried out most of the experiments and participated in drafting the manuscript. EMa participated to the generation of the data. ILM participated in the RhoA activation experiments and manuscript review. BC participated to the RhoB overexpression experiment by producing the Adenoviral constructs. YB generated the immunocytochemistry data with EMe. TF performed the statistical analysis. GCP supplied the RhoB deficient mice and reviewed the manuscript. GF was strongly involved in data discussion and manuscript review. FD helped to analyze the results and coordinate the study. SDS conceived the study, coordinated the analysis and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Legends to figures

Figure 1: Effect of RhoB expression on HDAC1 expression in MCF-7 cells

A and B: After 24h of culture, MCF-7 cells were transfected with control siRNA (siC) or sequences *versus* RhoB (siB1, siB2). 48h later, cells were lysed and HDAC1 expression was evaluated by western blot (A), immunochemistry (B) or by RT-PCR (C).

In Figure 1C, error bars represent the mean values \pm SD from triplicate conditions, Figure 1A is representative of 3 experiments.

D: After 24h of culture, MCF-7 were transfected with Adenovirus control (AdC) or Adenovirus RhoB (AdRhoB) at MOI 100. 48h later, cells were lysed and HDAC1, RhoB, HDAC1, ER α and actin expressions were evaluated by western blot. Representative of 3 experiments.

Figure 2: Effect of RhoB expression on HDAC1 expression in RhoB deficient mice

A: Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were lysed and ER α , RhoB, HDAC1 and actin expressions were determined by western blot. Representative of 3 experiments.

B and C: On 6 weeks old mice, uteri were collected and lysed. ER α , RhoB, HDAC1 and actin expressions were determined by western blot (B) and ER α , RhoB and HDAC1 mRNA expressions by qRT-PCR, relative to GAPDH expression (C). In Figure 2C, error bars represent the mean values \pm SD from triplicate conditions.

Figure 3: Effect of MG132 on RhoB control of HDAC1 expression in MCF-7 cells

After 24h of culture, MCF-7 were transfected with siRNA control (siC) or siRNA *versus* RhoB (B2). 48h later, cells were treated with MG132 (4 μ M) during 7h. After this treatment, cells were lysed and HDAC1, RhoB and actin expressions were evaluated by western blot. Representative of 3 experiments.

Figure 4: Reciprocal effects of RhoB and HDAC1 down-regulations on their respective expressions in 4 breast cancer cell lines

After 24h of culture, MCF-7, T47D, SK-BR-3 and MDA-MB 231 cells were transfected with siRNA control (siC) or sequence *versus* RhoB (siB6) or HDAC1 (siHDAC1). 48h later, cells were lysed.

A: RhoB, ER α , HDAC1 and actin expressions were evaluated by western blot. Representative of 3 experiments.

B: RhoB, ER α and HDAC1 expressions were quantified by qRT-PCR in MCF-7 cells. Error bars represent the mean values \pm SD from triplicate conditions.

Figure 5: Effect of RhoB down-regulation on HDAC1 recruitment on different genes in MCF-7 cells

After 24h of culture, MELN cells were transfected with siRNA control (siC) or sequence *versus* RhoB (siB1). After 3 days without estrogen followed by 1h of E₂ stimulation, cells were lysed, sonicated and immunoprecipitation of HDAC1 was performed. Quantification of the recruitment of HDAC1 on the different genes promoters was performed by quantitative PCR. Representative of 3 experiments.

Supplemental Figure 1: Effect of RhoA and RhoB down-regulation on the expression of SRC-1, SRC-3 and HDAC1 in MCF-7 cells

After 24h of culture, MCF-7 cells were transfected with siRNA control (siC), siRNA *versus* RhoA (siA2) or *versus* RhoB (siB11) with estrogen or not. 48h later, cells were lysed and SRC-1, SRC-3, HDAC1 and actin expressions were evaluated by western blot. Representative of 2 experiments.

Supplemental Figure 2: Effect of HDAC1 inhibition on MCF-7 proliferation

B: After 24h of culture, MCF-7 were transfected with siRNA control (C) or sequence *versus* HDAC1. The last day of counting, HDAC1 and actin expressions were evaluated by western blot. Representative of 3 experiments.

Conclusion

L'ensemble de nos résultats a donc démontré l'existence d'une régulation positive entre la protéine RhoB et le corépresseur HDAC1 dans des modèles de cancers du sein hormonodépendants ou non. Ceci a déjà été décrit dans des modèles de cellules de cancers pulmonaires mais pas dans des modèles de cancers du sein à ce jour.

Nous avons mis en évidence tout d'abord dans des modèles *in vitro*, mais également *in vivo*, que RhoB régule positivement l'expression d'HDAC1. Il est important de souligner que RhoA ne présente aucun effet notable sur l'expression de HDAC1 dans les cellules MCF-7. RhoB apparaît comme ayant un rôle régulateur de HDAC1 dans les cellules cancéreuses mammaires, de manière indépendante du statut hormonal. Effectivement, l'effet de RhoB a été confirmé sur 4 lignées de statut hormonal différent et nous avons observé la modification de l'expression de HDAC1 à la fois en absence et en présence d'E₂ dans les cellules MCF-7. *In vitro*, l'inhibition de HDAC1 lors de l'extinction de RhoB est plus marquée au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que RhoB semble contrôler la dégradation par le protéasome de HDAC1. Nous mesurerons les temps de demi-vie de HDAC1 sous l'influence de RhoB pour mieux en comprendre le mécanisme. Il existe donc fort probablement une régulation post-transcriptionnelle avec une modification de la stabilité de la protéine HDAC1, mais également, des régulations de l'expression de HDAC1 par la présence de micro-ARN sont maintenant décrites. Dans le modèle de souris déficientes en RhoB, les diminutions des taux d'ARNm et de protéines sont plus marquées et corrélées, ce qui n'élimine pas la possibilité de régulations post-transcriptionnelles exercées par RhoB sur l'expression de HDAC1 dans des conditions physiologiques.

Nous avons montré précédemment que l'extinction de RhoB inhibe la prolifération des cellules MCF-7 mais pas celle de cellules RE négatives (résultats soumis). Nous avons montré dans cette étude que l'inhibition d'HDAC1, qui entraîne un certain niveau d'inhibition de l'expression de RhoB dans les 4 lignées RE positives et RE négatives analysées, n'a pas d'effet sur la prolifération des

cellules MCF-7. Le dialogue existant entre RhoB et HDAC1 semble donc ne pas avoir un impact majeur sur la prolifération.

Enfin, nous avons démontré que le recrutement d'HDAC1 lors de l'extinction de RhoB varie en fonction des gènes cibles du RE α considérés et n'est donc pas la conséquence directe de l'expression totale d'HDAC1. Toutefois, aucune corrélation entre ces recrutements différentiels et l'expression de ces gènes n'a été observée (données non montrées). L'existence d'une interaction physique directe entre HDAC1 et RhoB est à envisager car à la différence de RhoA et RhoC, RhoB a été décrit comme pouvant avoir une localisation nucléaire (travaux soumis et [37]).

L'extension de nos résultats à d'autres HDACs, notamment à d'autres HDACs de la classe I à laquelle appartient HDAC1, permettra de déterminer si RhoB a un effet spécifique sur HDAC1 et si inversement, d'autres HDAC contrôlent l'expression et les activités de RhoB. Ceci est particulièrement important dans la mesure où les inhibiteurs d'HDAC actuellement développés tendent à évoluer vers de nouvelles molécules présentant une plus grande spécificité à l'égard d'une classe ou même d'une HDAC donnée [37].

L'ensemble de ces résultats démontre un autre rôle possible de RhoB dans la cancérogénèse mammaire, indépendamment du statut hormonal. Cette protéine qui a un rôle de pro-oncogène dans des modèles de cancers du sein hormonodépendants, régulerait l'expression d'HDAC1, corépresseur du RE α . Toutefois, l'importance relative de ces deux phénomènes l'un par rapport à l'autre reste encore à déterminer.

References

1. Jaffe AB, Hall A: Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* 2002, 84:57-80.
2. Jahner D, Hunter T: The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991, 11(7):3682-3690.
3. de Cremoux P, Gauville C, Closson V, Linares G, Calvo F, Tavitian A, Olofsson B: EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines. *Int J Cancer* 1994, 59(3):408-415.
4. Gampel A, Mellor H: Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo. *Biochem J* 2002, 366(Pt 2):393-398.
5. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C: Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1796(2):91-98.
6. Heasman SJ, Ridley AJ: Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, 9(9):690-701.
7. Gampel A, Parker PJ, Mellor H: Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol* 1999, 9(17):955-958.
8. Zalcman G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian A, Olofsson B: Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* 1995, 10(10):1935-1945.
9. Engel ME, Datta PK, Moses HL: RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *J Biol Chem* 1998, 273(16):9921-9926.
10. Liu A, Du W, Liu JP, Jessell TM, Prendergast GC: RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol* 2000, 20(16):6105-6113.
11. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Munoz-Antonia T: Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002, 8(7):2225-2232.
12. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E: Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res* 2006, 66(1):482-489.
13. Fritz G, Kaina B, Aktories K: The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 1995, 270(42):25172-25177.
14. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G: RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling. *J Biol Chem* 2005, 280(52):43257-43263.
15. Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, Favre G: RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 2002, 21(39):5998-6006.
16. Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Baron R, Bonnet J, Cohen-Jonathan E *et al*: Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ* 2005, 12(5):492-501.
17. Jiang K, Delarue FL, Sebti SM: EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 2004, 23(5):1136-1145.

18. Mazieres J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, Sebti SM, Favre G, Pradines A: Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells. *Exp Cell Res* 2005, 304(2):354-364.
19. Moscow JA, He R, Gnarr JR, Knutsen T, Weng Y, Zhao WP, Whang-Peng J, Linehan WM, Cowan KH: Examination of human tumors for rhoA mutations. *Oncogene* 1994, 9(1):189-194.
20. Rihet S, Vielh P, Camonis J, Goud B, Chevillard S, de Gunzburg J: Mutation status of genes encoding RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases in a panel of invasive human colorectal and breast tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001, 127(12):733-738.
21. Lahoz A, Hall A: DLC1: a significant GAP in the cancer genome. *Genes Dev* 2008, 22(13):1724-1730.
22. Wheeler AP, Ridley AJ: Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* 2004, 301(1):43-49.
23. Bellizzi A, Mangia A, Chiriatti A, Petroni S, Quaranta M, Schittulli F, Malfettone A, Cardone RA, Paradiso A, Reshkin SJ: RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *Int J Mol Med* 2008, 22(1):25-31.
24. Fritz G, Brachetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B: Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer* 2002, 87(6):635-644.
25. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA: Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 2009, 74(7):622-627.
26. Krusche CA, Wulfing P, Kersting C, Vloet A, Bocker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J: Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 90(1):15-23.
27. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi S, Iwase H: HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(20):6962-6968.
28. Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, Di GH, Shen ZZ, Shao ZM: ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, 134(8):883-890.
29. Delarue FL, Adnane J, Joshi B, Blaskovich MA, Wang DA, Hawker J, Bizouarn F, Ohkanda J, Zhu K, Hamilton AD *et al*: Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter. *Oncogene* 2007, 26(5):633-640.
30. Mazieres J, Tovar D, He B, Nieto-Acosta J, Marty-Detraves C, Clanet C, Pradines A, Jablons D, Favre G: Epigenetic regulation of RhoB loss of expression in lung cancer. *BMC Cancer* 2007, 7:220.
31. Couderc B, Pradines A, Rafii A, Golzio M, Deviers A, Allal C, Berg D, Penary M, Teissie J, Favre G: In vivo restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression. *Cancer Gene Ther* 2008, 15(7):456-464.
32. Billon-Gales A, Fontaine C, Filipe C, Douin-Echinard V, Fouque MJ, Flouriot G, Gourdy P, Lenfant F, Laurell H, Krust A *et al*: The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106(6):2053-2058.
33. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F: Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 2003, 115(6):751-763.

34. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G: Loss of RhoB expression in human lung cancer progression. *Clin Cancer Res* 2004, 10(8):2742-2750.
35. El Marzouk S, Schultz-Norton JR, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM: Rho GDP dissociation inhibitor alpha interacts with estrogen receptor alpha and influences estrogen responsiveness. *J Mol Endocrinol* 2007, 39(4):249-259.
36. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, Giardina C, Dahiya R: miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. *Oncogene* 2009, 28(14):1714-1724.
37. Singletary SE, Robb GL: Oncologic safety of skin-sparing mastectomy. *Ann Surg Oncol* 2003, 10(2):95-97.

Figure 1

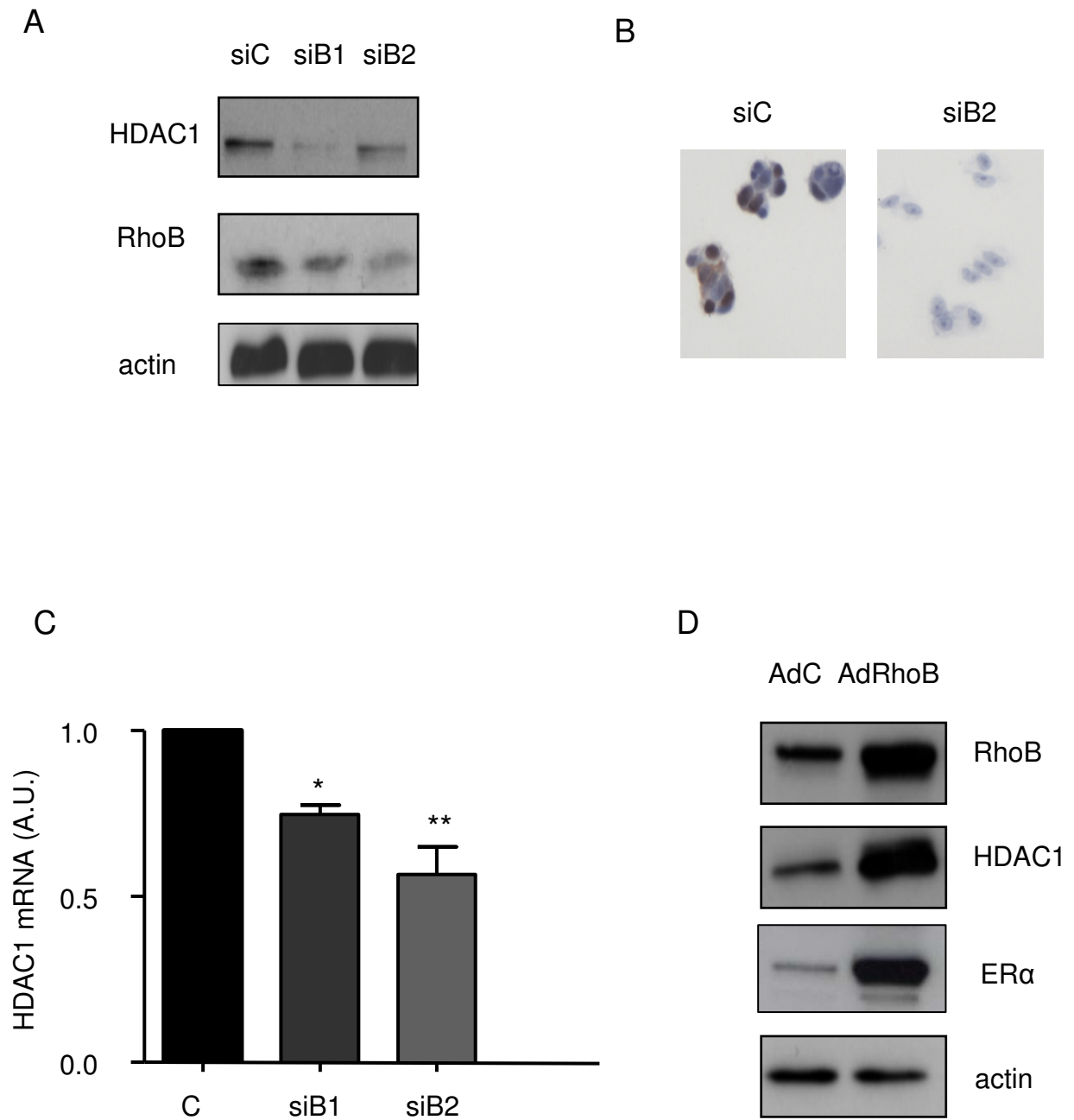


Figure 2

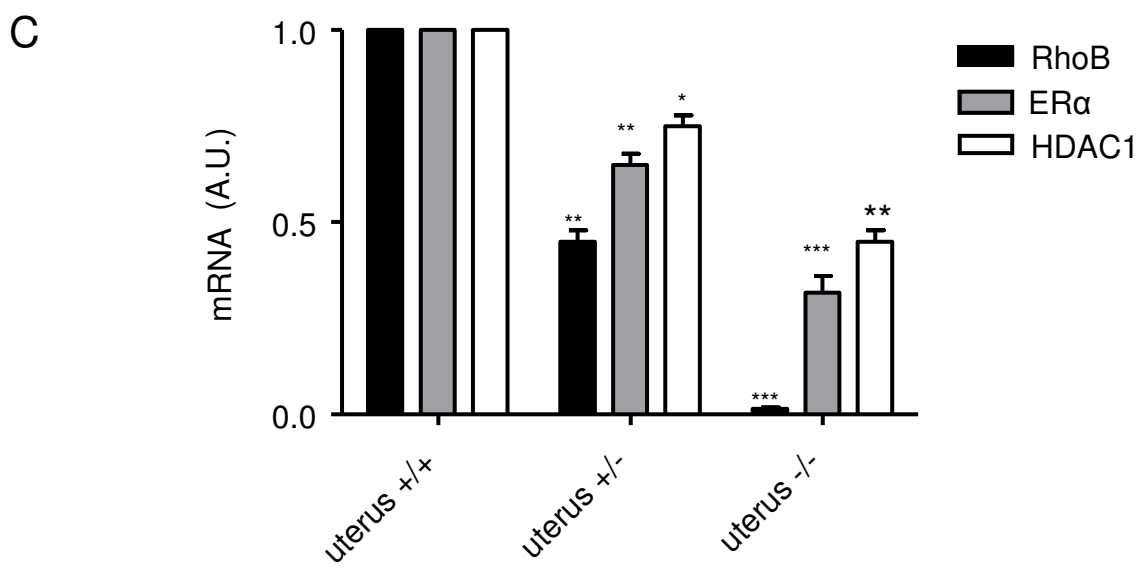
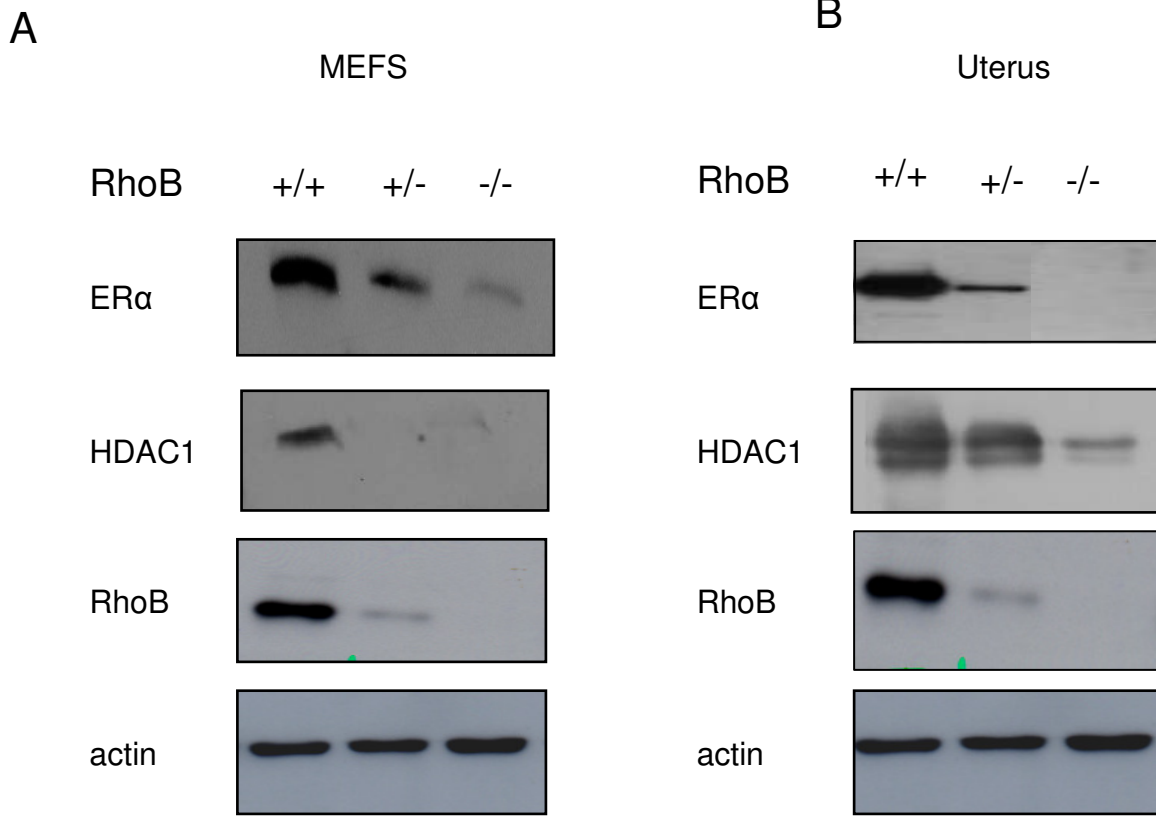


Figure 3

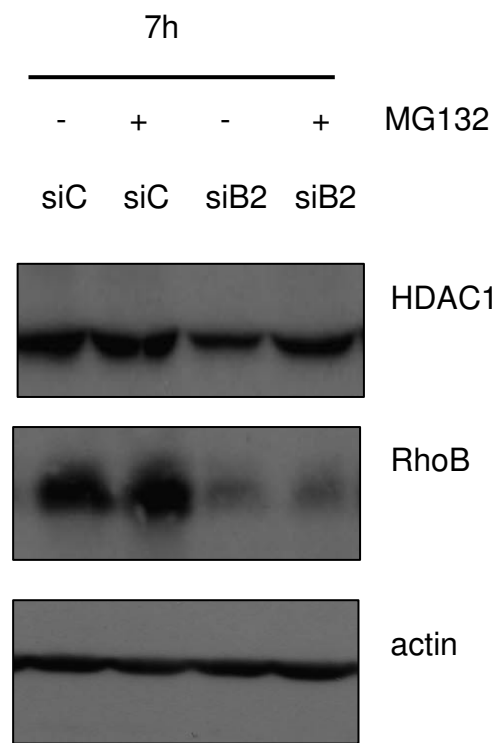
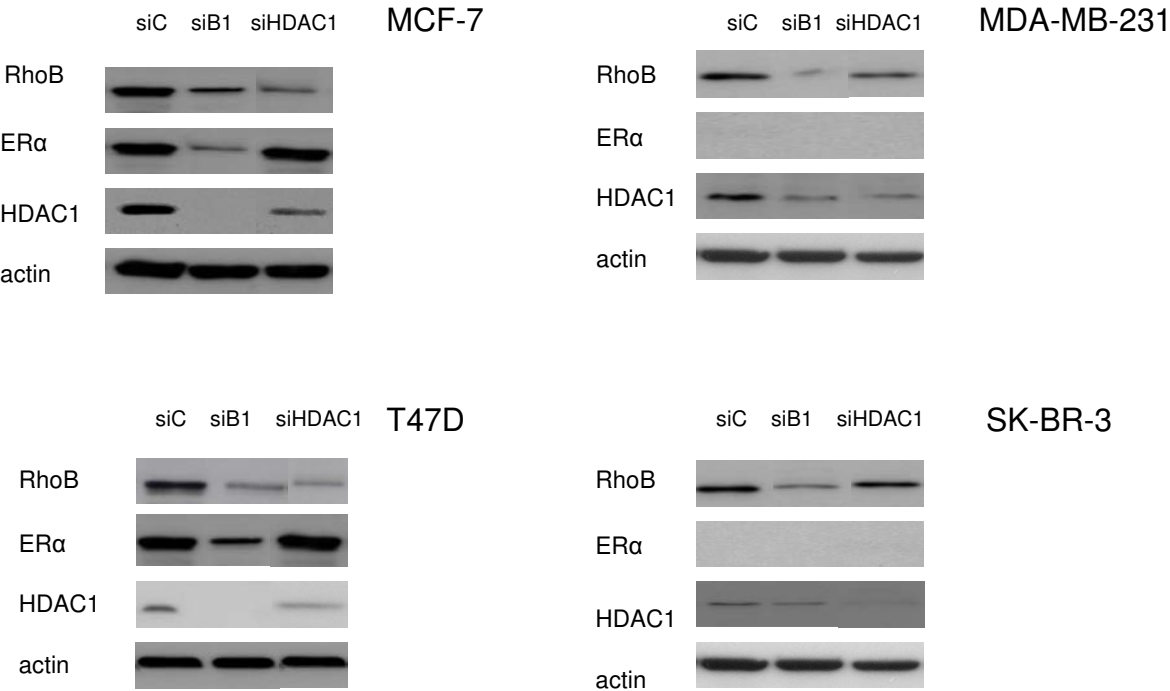


Figure 4

A



B

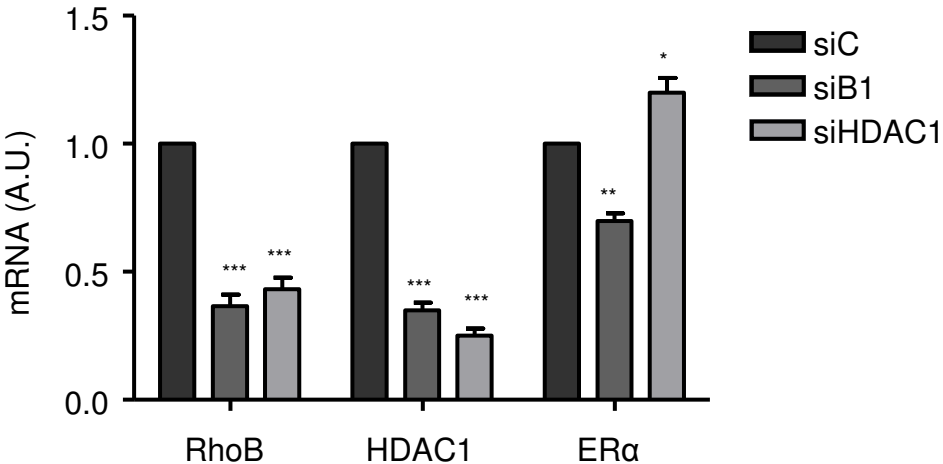
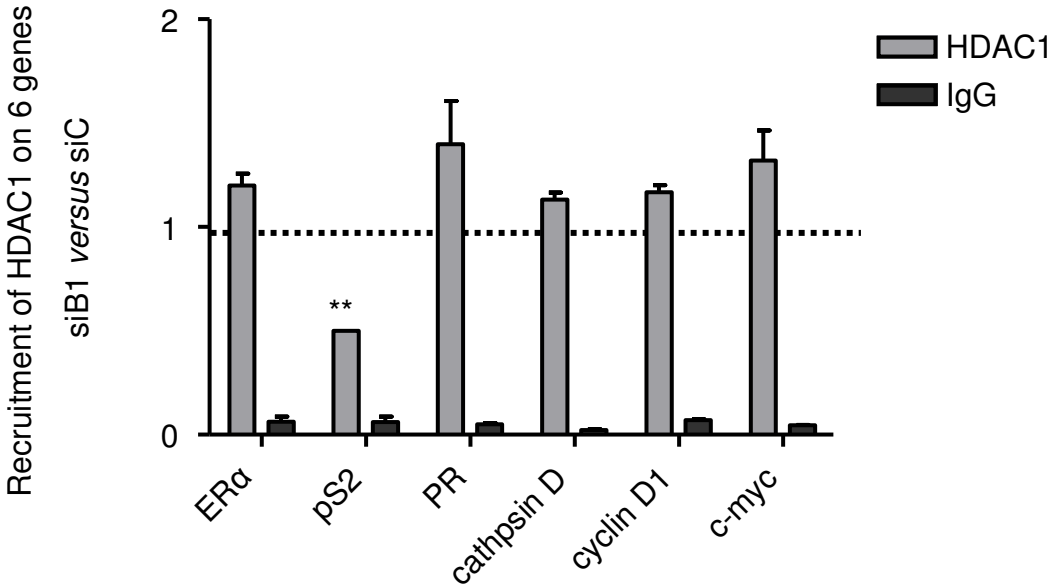
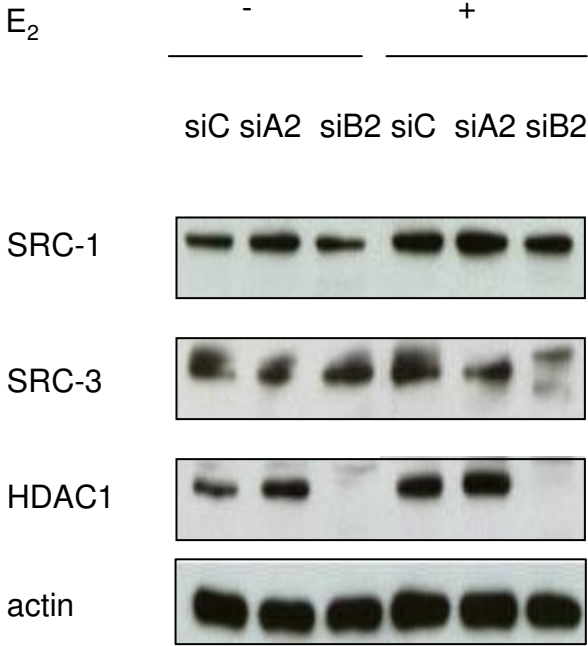


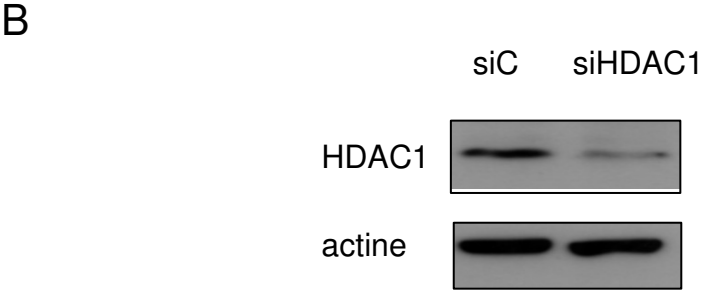
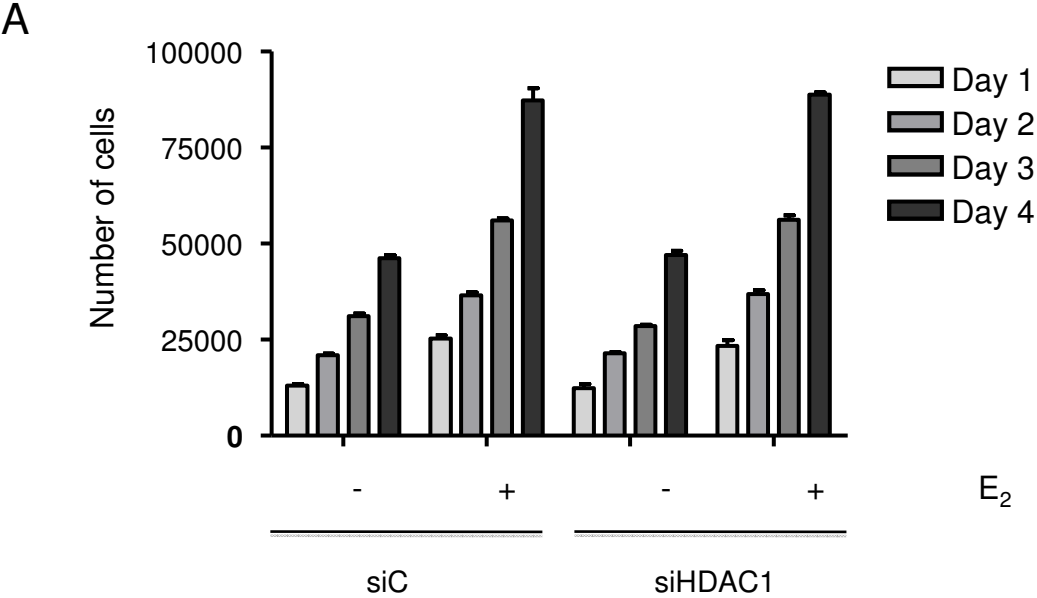
Figure 5



Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Discussion

L'ensemble de nos résultats a donc démontré l'existence d'un dialogue réciproque entre la protéine RhoB et le corépresseur HDAC1 dans des modèles de cancers du sein hormonodépendants ou non. Cet effet avait déjà été démontré dans des modèles de cellules de cancers pulmonaires mais pas dans des modèles de cancers du sein à ce jour.

Nous avons mis en évidence tout d'abord dans des modèles *in vitro* mis également *in vivo* que RhoB régule positivement l'expression d'HDAC1. Il est important de souligner que RhoA ne présente aucun effet notable sur l'expression de HDAC1 dans les cellules MCF-7. RhoB apparaît comme ayant un rôle régulateur de HDAC1 dans les cellules cancéreuses mammaires de manière indépendante du statut hormonal. Effectivement, l'effet de RhoB a été confirmé sur 4 lignées de statut hormonal différent et nous avons observé la modification de l'expression de HDAC1 à la fois en absence et en présence d'E₂ dans les cellules MCF-7. *In vitro*, l'inhibition de HDAC1 lors de l'extinction de RhoB est plus marquée au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm. De plus, RhoB semble contrôler la dégradation par le protéasome de HDAC1. Nous mesurerons les temps de demi-vie de HDAC-1 sous l'influence de RhoB pour mieux en comprendre le mécanisme. Il existe donc fort probablement une régulation post-transcriptionnelle avec une modification de la stabilité de la protéine HDAC1, mais également, la présence de micro-ARN régulant l'expression de HDAC1 est possible. En effet, il a été décrit dans des cellules cancéreuses prostatiques que miR-449a réprime l'expression de HDAC1, entraînant un arrêt de la croissance cellulaire [348]. Dans le modèle de souris déficientes en RhoB, les diminutions des taux d'ARNm et de protéines sont plus marquées et sont toujours corrélées et confirment la possibilité de régulations post-transcriptionnelles exercées par RhoB sur l'expression de HDAC1.

Nous avons montré précédemment que l'extinction de RhoB inhibe la prolifération des cellules MCF-7 mais pas de cellules RE négatives (résultats soumis). Nous avons montré dans cette

étude que l'inhibition d'HDAC1, qui entraîne un certain niveau d'inhibition de l'expression de RhoB dans les 4 lignées RE positives et RE négatives analysées, n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules MCF-7. Le dialogue existant entre RhoB et HDAC1 semble donc ne pas avoir un impact majeur sur la prolifération dans le modèle et les conditions que nous avons étudiés.

Enfin, nous avons démontré que le recrutement d'HDAC1 lors de l'extinction de RhoB varie en fonction des gènes cibles du RE α considérés et n'est donc pas la conséquence directe de l'expression totale d'HDAC1. Toutefois, aucune corrélation entre ces recrutements différentiels et l'expression de ces gènes n'a été observée (données non montrées).

L'existence d'une interaction physique directe entre HDAC1 et RhoB est à envisager car à la différence de RhoA et RhoC, RhoB a été décrit comme pouvant avoir une localisation nucléaire (travaux soumis). L'extension de nos résultats à d'autres HDACs, notamment à d'autres HDACs de la classe I à laquelle appartient HDAC1, permettra de déterminer si RhoB a un effet spécifique sur HDAC1 et inversement. Ceci est particulièrement important dans la mesure où les inhibiteurs d'HDAC actuellement développés tendent à évoluer vers de nouvelles molécules présentant une plus grande spécificité à l'égard d'une classe ou même d'une HDAC donnée [313]. Si les inhibiteurs d'HDAC répriment suffisamment l'expression de RhoB, leur effet anti-prolifératif sera amplifié ou à l'inverse contrarié en fonction du rôle spécifique de RhoB dans le modèle cellulaire considéré,

L'ensemble de ces résultats démontre donc un autre rôle possible de RhoB dans la cancérogenèse mammaire, indépendamment du statut hormonal. Cette protéine qui a un rôle de pro-oncogène dans des modèles de cancers du sein hormonodépendants, régulerait l'expression d'HDAC1, corépresseur du RE α . Toutefois, l'importance relative de ces deux phénomènes l'un par rapport à l'autre reste encore à déterminer.

CONCLUSION GENERALE

La découverte des RE, puis des voies de signalisation oestrogéniques associées, s'est avérée d'une grande utilité dans le développement des traitements des cancers du sein. Elle a permis de comprendre l'efficacité du mécanisme de castration utilisée depuis Beatson à des fins thérapeutiques, de réserver l'hormonothérapie aux tumeurs exprimant les RH et de développer plusieurs molécules (anti-œstrogènes puis AAs). Cependant, les cliniciens sont quotidiennement confrontés aux problèmes de résistances qu'elles soient *de novo* ou acquises, après une phase plus ou moins longue d'hormonosensibilité. Depuis plusieurs années, le travail des chercheurs a permis une meilleure compréhension des différentes voies de signalisation oestrogénique et de leurs interactions complexes avec les autres voies de signalisation intracellulaires. De nouvelles associations thérapeutiques, actuellement objet d'étude clinique, sont la conséquence de cette recherche.

Dans notre équipe, l'axe initial de recherche visait à déterminer si les protéines prénylées étaient impliquées dans la régulation du RE α et par quels mécanismes. Il a tout d'abord été mis en évidence que des protéines prénylées contrôlent positivement la prolifération des cellules MCF-7 et négativement la transcription dépendante d'un ERE dans des cellules MELN [196]. Ces résultats ont été complétés par l'étude *in vitro* des effets de l'association du tamoxifène avec des inhibiteurs de farnésyl transférase (FTI-277 et R115, 777) [214 , 215]. Après avoir démontré que l'association tamoxifène et inhibiteur de FTI pouvait avoir un effet au moins additif sur l'inhibition de la prolifération des cellules MCF-7, une étude clinique de phase II a été initiée après obtention d'un PHRC. Bien que l'objectif principal de l'étude n'ait pas été atteint (seulement une patiente sur 20 a présenté une réponse objective), un bénéfice clinique a été observé pour 50% des patientes avec une durée moyenne du bénéfice de 10,2 mois [215]. De plus, la possibilité d'identifier un marqueur précoce (à 2 mois), de réponse au traitement (peptide du fibrinogène α) par analyse protéomique s'est révélée particulièrement prometteuse.

Ensuite, en utilisant la C3 exoenzyme, il est apparu qu'au moins une des protéines Rho (Rho A, B et C) pouvait avoir un effet négatif sur la transcription dépendante du RE α [342].

L'objectif de mon travail de thèse a donc été d'identifier le rôle spécifique de chacune de ces protéines Rho dans les activités du RE α .

Dans un premier temps, nous démontrons que les 3 protéines Rho modifient le recrutement du RE α lui-même sur des gènes cibles, alors que seuls RhoA et RhoB contrôlent la transcription dépendante du RE α . Ces contrôles ne sont pas identiques pour RhoA et RhoB et sont également spécifiques pour chaque gène cible considéré. Ceci est en accord avec l'extrême diversité et complexité de chaque complexe de cofacteurs recrutés de façon dynamique pour permettre la stimulation ou au contraire le freinage de la transcription d'un gène donné.

Ensuite, nous démontrons que RhoA, RhoB et RhoC régulent également mais de manière différente l'expression du RE α . L'étude des mécanismes par lesquels passe cette régulation permettra de mieux comprendre les effets spécifiques de chacune de ces protéines. En effet, les régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles potentiellement exercées par RhoB ont certainement des implications différentes de la régulation exclusivement post-transcriptionnelle observée pour RhoA. Toute modification de l'expression, de la stabilité, des phosphorylations et acétylations du RE α (ARNm et/ou protéine) peuvent en effet avoir des conséquences sur le passage à l'hormonosensibilité ou l'hormonorésistance d'une cellule tumorale.

Enfin, nous avons mis en évidence un rôle activateur de RhoB sur la prolifération et donc un rôle de pro-oncogène spécifique aux cellules mammaires hormonodépendantes. L'ensemble de nos résultats souligne *in vitro* et *in vivo* l'importance des liens réciproques existant entre RhoB et le RE α , avec la possibilité pour E₂ de stimuler le passage rapide de RhoB vers son état actif lié au GTP.

Dans une dernière partie qui est en cours, nous mettons en évidence l'existence d'un dialogue entre HDAC1 et RhoB dans divers modèles cellulaires de cancers du sein RE négatifs ou non et *in vivo*. Le contrôle positif très fort exercé par RhoB sur HDAC1 est ici indépendant de la présence ou de l'absence du RE α et apparaît majoritairement au niveau protéique. Ce travail sera poursuivi dans les semaines à venir avec une collaboration avec l'équipe de Vincent Cavaillès à Montpellier (INSERM U896). Nous déterminerons si RhoB contrôle l'expression uniquement de HDAC1 ou s'il peut aussi moduler l'expression d'autres HDACs de la classe I. Il sera également important de caractériser l'existence ou non d'une interaction directe entre RhoB et HDAC1 et les mécanismes par lesquels RhoB régule l'expression de HDAC1 (temps de demi-vie, dégradation, modifications post-traductionnelles).

En conclusion, ces travaux ont permis d'établir que chacune des 3 protéines Rho étudiées joue bien un rôle spécifique dans les voies de signalisation associées au RE α . Leur implication dans les réponses physiologiques du RE α aux stimulations œstrogéniques et dans la sensibilité à l'hormonothérapie des cancers du sein restent autant de domaines à étudier. En effet, RhoA, RhoB et RhoC jouent potentiellement un rôle dans les étapes essentielles que sont l'évolution d'une cellule normale vers une cellule tumorale, l'augmentation de l'agressivité d'une tumeur, la modification de son statut hormonal et l'acquisition de résistances aux traitements. Les analyses de l'expression des protéines Rho, soit totale, soit sous leur forme active et/ou phosphorylée est à envisager sur des échantillons importants de tumeurs de patientes afin de rechercher des corrélations avec différents facteurs pronostiques.

Une caractéristique de ce travail aura été de toujours travailler en lien étroit avec les services cliniques et d'anatomopathologie de l'Institut Claudius Regaud et les autres équipes toulousaines ou régionales impliquées dans ce domaine, grâce entre autres aux réseaux ResisTH et au RTRS (Fondation RITC). Une préoccupation majeure en cancérologie mammaire aujourd'hui est en effet de développer une recherche en transfert qui facilite le

développement d'essais cliniques mûrement réfléchis entre chercheurs et cliniciens. Les données biologiques qui pourront être ainsi recueillies et analysées devraient servir à renforcer toute recherche effectuée en amont.

BIBLIOGRAPHIE

1. Veronesi U, Viale G, Rotmensz N, Goldhirsch A: **Rethinking TNM: breast cancer TNM classification for treatment decision-making and research.** *Breast* 2006, **15**(1):3-8.
2. Bloom HJ, Richardson WW: **Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years.** *Br J Cancer* 1957, **11**(3):359-377.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
4. Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, Luini A, Veronesi P, Intra M, Orecchia R *et al*: **Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation.** *Ann Oncol* 2002, **13**(2):273-279.
5. Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M: **Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study.** *Bmj* 2000, **320**(7233):474-478.
6. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, Veronesi P, Torrì R, Montagna E, Luini A *et al*: **Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer.** *Ann Oncol*.
7. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S *et al*: **Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.** *Jama* 2006, **295**(21):2492-2502.
8. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parisè CA, Caggiano V: **Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry.** *Cancer* 2007, **109**(9):1721-1728.
9. Rosen EM, Fan S, Ma Y: **BRCA1 regulation of transcription.** *Cancer Lett* 2006, **236**(2):175-185.
10. Brody LC, Biesecker BB: **Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2.** *Medicine (Baltimore)* 1998, **77**(3):208-226.
11. Singletary SE, Robb GL: **Oncologic safety of skin-sparing mastectomy.** *Ann Surg Oncol* 2003, **10**(2):95-97.
12. Campagnoli C, Ambroggio S, Lotano MR, Peris C: **Progestogen use in women approaching the menopause and breast cancer risk.** *Maturitas* 2009, **62**(4):338-342.
13. Miyakis S, Sourvinos G, Spandidos DA: **Differential expression and mutation of the ras family genes in human breast cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **251**(2):609-612.
14. Fritz G, Brchetti C, Bahlmann F, Schmidt M, Kaina B: **Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters.** *Br J Cancer* 2002, **87**(6):635-644.
15. Fritz G, Just I, Kaina B: **Rho GTPases are over-expressed in human tumors.** *Int J Cancer* 1999, **81**(5):682-687.
16. Feinberg AP, Tycko B: **The history of cancer epigenetics.** *Nat Rev Cancer* 2004, **4**(2):143-153.
17. Widschwendter M, Jones PA: **DNA methylation and breast carcinogenesis.** *Oncogene* 2002, **21**(35):5462-5482.

18. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE: **Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 1994, **54**(10):2552-2555.
19. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB: **DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci.** *Nat Genet* 2000, **25**(3):269-277.
20. Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP: **ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance.** *Eur J Cancer* 1998, **34**(6):791-808.
21. Andreasen PA, Kjoller L, Christensen L, Duffy MJ: **The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review.** *Int J Cancer* 1997, **72**(1):1-22.
22. Stephens RW, Brunner N, Janicke F, Schmitt M: **The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, **52**(1-3):99-111.
23. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ *et al*: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**(25):1999-2009.
24. Jensen EV, DeSombre ER: **Estrogen-receptor interaction.** *Science* 1973, **182**(108):126-134.
25. Milla-Santos A, Milla L, Rallo L, Solano V: **Phase III randomized trial of toremifene vs tamoxifen in hormonodependant advanced breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2001, **65**(2):119-124.
26. Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, Farrerons J, Karasik A, Mellstrom D, Ng KW *et al*: **Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-year results from the MORE trial. Multiple outcomes of raloxifene evaluation.** *Breast Cancer Res Treat* 2001, **65**(2):125-134.
27. Long X, Nephew KP: **Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor-alpha.** *J Biol Chem* 2006, **281**(14):9607-9615.
28. Robertson JF: **ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data.** *Br J Cancer* 2001, **85 Suppl 2**:11-14.
29. Dalenc F, Doisneau-Sixou SF, Allal BC, Marsili S, Lauwers-Cances V, Chaoui K, Schiltz O, Monsarrat B, Filleron T, Renee N *et al*: **Tipifarnib plus tamoxifen in tamoxifen-resistant metastatic breast cancer: a negative phase II and screening of potential therapeutic markers by proteomic analysis.** *Clin Cancer Res*, **16**(4):1264-1271.
30. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC: **Production and actions of estrogens.** *N Engl J Med* 2002, **346**(5):340-352.
31. Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA: **Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora.** *Nutr Cancer* 2000, **36**(1):27-32.
32. de Cremoux P, This P, Leclercq G, Jacquot Y: **Controversies concerning the use of phytoestrogens in menopause management: bioavailability and metabolism.** *Maturitas*, **65**(4):334-339.
33. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M *et al*: **Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.** *Physiol Rev* 2007, **87**(3):905-931.
34. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P: **Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A.** *Nature* 1986, **320**(6058):134-139.

35. Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D: **Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors.** *Breast Cancer Res* 2000, **2**(5):353-359.
36. Osborne CK, Schiff R, Fuqua SA, Shou J: **Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation.** *Clin Cancer Res* 2001, **7**(12 Suppl):4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
37. Cowley SM, Parker MG: **A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999, **69**(1-6):165-175.
38. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P: **Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression.** *Endocr Relat Cancer* 2004, **11**(3):537-551.
39. Zhao C, Lam EW, Sunters A, Enmark E, De Bella MT, Coombes RC, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K: **Expression of estrogen receptor beta isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation.** *Oncogene* 2003, **22**(48):7600-7606.
40. Hartman J, Strom A, Gustafsson JA: **Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications.** *Steroids* 2009, **74**(8):635-641.
41. Jensen EV, Cheng G, Palmieri C, Saji S, Makela S, Van Noorden S, Wahlstrom T, Warner M, Coombes RC, Gustafsson JA: **Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(26):15197-15202.
42. Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL: **Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease.** *Cancer Lett*, **288**(2):133-148.
43. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F: **Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1.** *Embo J* 2000, **19**(17):4688-4700.
44. Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Strom A, Toresson G, Lam EW, Cheng G, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K: **Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**(8):3955-3962.
45. Dutertre M, Smith CL: **Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor-alpha: regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains.** *Mol Endocrinol* 2003, **17**(7):1296-1314.
46. Santen RJ, Fan P, Zhang Z, Bao Y, Song RX, Yue W: **Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells.** *Steroids* 2009, **74**(7):586-594.
47. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U: **Genomic targets of nuclear estrogen receptors.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(8):1859-1875.
48. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoutte J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF *et al*: **Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites.** *Nat Genet* 2006, **38**(11):1289-1297.
49. Safe S, Abdelrahim M: **Sp transcription factor family and its role in cancer.** *Eur J Cancer* 2005, **41**(16):2438-2448.
50. Welboren WJ, Sweep FC, Span PN, Stunnenberg HG: **Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated?** *Endocr Relat Cancer* 2009, **16**(4):1073-1089.

51. Frasor J, Weaver A, Pradhan M, Dai Y, Miller LD, Lin CY, Stanculescu A: **Positive cross-talk between estrogen receptor and NF-kappaB in breast cancer.** *Cancer Res* 2009, **69**(23):8918-8925.
52. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA: **Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways.** *Steroids* 2009, **74**(7):622-627.
53. Di Domenico M, Castoria G, Bilancio A, Migliaccio A, Auricchio F: **Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth.** *Cancer Res* 1996, **56**(19):4516-4521.
54. Zhang Z, Kumar R, Santen RJ, Song RX: **The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action.** *Steroids* 2004, **69**(8-9):523-529.
55. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER: **ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**(1):100-115.
56. Barletta F, Wong CW, McNally C, Komm BS, Katzenellenbogen B, Cheskis BJ: **Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(5):1096-1108.
57. Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ: **Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer.** *Genomics* 1997, **45**(3):607-617.
58. Filardo EJ, Quinn JA, Sabo E: **Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor.** *Steroids* 2008, **73**(9-10):870-873.
59. Maggiolini M, Picard D: **The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor.** *J Endocrinol*, **204**(2):105-114.
60. Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Ando S, Maggiolini M: **The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(3):631-646.
61. Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, Oprea TI, Prossnitz ER, Musti AM, Ando S *et al*: **G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells.** *Cancer Res* 2007, **67**(4):1859-1866.
62. Pancholi S, Lykkesfeldt AE, Hilmi C, Banerjee S, Leary A, Drury S, Johnston S, Dowsett M, Martin LA: **ERBB2 influences the subcellular localization of the estrogen receptor in tamoxifen-resistant MCF-7 cells leading to the activation of AKT and RPS6KA2.** *Endocr Relat Cancer* 2008, **15**(4):985-1002.
63. Yang Z, Barnes CJ, Kumar R: **Human epidermal growth factor receptor 2 status modulates subcellular localization of and interaction with estrogen receptor alpha in breast cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(11):3621-3628.
64. Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F: **Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter.** *Cell* 2003, **115**(6):751-763.
65. Chen D, Huang SM, Stallcup MR: **Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300.** *J Biol Chem* 2000, **275**(52):40810-40816.
66. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW: **Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**(6):657-666.

67. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R: **Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2003, **95**(5):353-361.
68. Leader JE, Wang C, Fu M, Pestell RG: **Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors.** *Biochem Pharmacol* 2006, **72**(11):1589-1596.
69. Murphy LC, Skliris GP, Rowan BG, Al-Dhaheri M, Williams C, Penner C, Troup S, Begic S, Parisien M, Watson PH: **The relevance of phosphorylated forms of estrogen receptor in human breast cancer in vivo.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009, **114**(1-2):90-95.
70. Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS: **Phosphorylation of the human estrogen receptor. Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity.** *J Biol Chem* 1994, **269**(6):4458-4466.
71. Murphy L, Cherlet T, Adeyinka A, Niu Y, Snell L, Watson P: **Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha detection in human breast tumors in vivo.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(4):1354-1359.
72. Joel PB, Traish AM, Lannigan DA: **Estradiol-induced phosphorylation of serine 118 in the estrogen receptor is independent of p42/p44 mitogen-activated protein kinase.** *J Biol Chem* 1998, **273**(21):13317-13323.
73. Jiang J, Sarwar N, Peston D, Kulinskaya E, Shousha S, Coombes RC, Ali S: **Phosphorylation of estrogen receptor-alpha at Ser167 is indicative of longer disease-free and overall survival in breast cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**(19):5769-5776.
74. Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL: **Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor.** *Mol Endocrinol* 2006, **20**(7):1479-1493.
75. Cui Y, Zhang M, Pestell R, Curran EM, Welshons WV, Fuqua SA: **Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity.** *Cancer Res* 2004, **64**(24):9199-9208.
76. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L: **Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(11):2671-2684.
77. Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N: **Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation.** *Mol Endocrinol* 1999, **13**(9):1522-1534.
78. Valley CC, Solodin NM, Powers GL, Ellison SJ, Alarid ET: **Temporal variation in estrogen receptor-alpha protein turnover in the presence of estrogen.** *J Mol Endocrinol* 2008, **40**(1):23-34.
79. Saceda M, Lindsey RK, Solomon H, Angeloni SV, Martin MB: **Estradiol regulates estrogen receptor mRNA stability.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998, **66**(3):113-120.
80. Heasman SJ, Ridley AJ: **Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**(9):690-701.
81. Boueux A, Vignal E, Faure S, Fort P: **Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**(1):203-216.
82. Wennerberg K, Der CJ: **Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it).** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 8):1301-1312.
83. Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brunger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, Kim SH: **Molecular switch for signal transduction: structural differences between active**

- and inactive forms of protooncogenic ras proteins.** *Science* 1990, **247**(4945):939-945.
84. Ihara K, Muraguchi S, Kato M, Shimizu T, Shirakawa M, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T: **Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue.** *J Biol Chem* 1998, **273**(16):9656-9666.
 85. Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A, Sander C: **The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids.** *Biochemistry* 1991, **30**(19):4637-4648.
 86. Freeman JL, Abo A, Lambeth JD: **Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65.** *J Biol Chem* 1996, **271**(33):19794-19801.
 87. Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R: **rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates.** *J Biol Chem* 1989, **264**(28):16378-16382.
 88. Dallery E, Galiegue-Zouitina S, Collyn-d'Hooghe M, Quief S, Denis C, Hildebrand MP, Lantoine D, Deweindt C, Tilly H, Bastard C *et al*: **TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma-associated LAZ3 gene by t(3;4) chromosomal translocation.** *Oncogene* 1995, **10**(11):2171-2178.
 89. Jahner D, Hunter T: **The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts.** *Mol Cell Biol* 1991, **11**(7):3682-3690.
 90. Vincent S, Settleman J: **The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization.** *Mol Cell Biol* 1997, **17**(4):2247-2256.
 91. Hansen SH, Zegers MM, Woodrow M, Rodriguez-Viciano P, Chardin P, Mostov KE, McMahon M: **Induced expression of Rnd3 is associated with transformation of polarized epithelial cells by the Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase pathway.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(24):9364-9375.
 92. Adamson P, Paterson HF, Hall A: **Intracellular localization of the P21rho proteins.** *J Cell Biol* 1992, **119**(3):617-627.
 93. Boivin D, Beliveau R: **Subcellular distribution and membrane association of Rho-related small GTP-binding proteins in kidney cortex.** *Am J Physiol* 1995, **269**(2 Pt 2):F180-189.
 94. Robertson D, Paterson HF, Adamson P, Hall A, Monaghan P: **Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids.** *J Histochem Cytochem* 1995, **43**(5):471-480.
 95. Baldassare JJ, Jarpe MB, Alferes L, Raben DM: **Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction.** *J Biol Chem* 1997, **272**(8):4911-4914.
 96. Michaely PA, Mineo C, Ying YS, Anderson RG: **Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface.** *J Biol Chem* 1999, **274**(30):21430-21436.
 97. Solski PA, Helms W, Keely PJ, Su L, Der CJ: **RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification.** *Cell Growth Differ* 2002, **13**(8):363-373.
 98. Milia J, Teyssier F, Dalenc F, Ader I, Delmas C, Pradines A, Lajoie-Mazenc I, Baron R, Bonnet J, Cohen-Jonathan E *et al*: **Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication.** *Cell Death Differ* 2005, **12**(5):492-501.

99. Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR: **Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding.** *J Cell Biol* 2001, **152**(1):111-126.
100. Zalzman G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian A, Olofsson B: **Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle.** *Oncogene* 1995, **10**(10):1935-1945.
101. Lebowitz PF, Prendergast GC: **Functional interaction between RhoB and the transcription factor DB1.** *Cell Adhes Commun* 1998, **6**(4):277-287.
102. Visvikis O, Maddugoda MP, Lemichez E: **Direct modifications of Rho proteins: deconstructing GTPase regulation.** *Biol Cell*, **102**(7):377-389.
103. Zhang FL, Casey PJ: **Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences.** *Annu Rev Biochem* 1996, **65**:241-269.
104. Moores SL, Schaber MD, Mosser SD, Rands E, O'Hara MB, Garsky VM, Marshall MS, Pompilano DL, Gibbs JB: **Sequence dependence of protein isoprenylation.** *J Biol Chem* 1991, **266**(22):14603-14610.
105. Schmidt A, Hall A: **Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch.** *Genes Dev* 2002, **16**(13):1587-1609.
106. Rossman KL, Der CJ, Sondek J: **GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**(2):167-180.
107. Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, Zheng Y: **Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product.** *J Biol Chem* 1994, **269**(1):62-65.
108. Brugnera E, Haney L, Grimsley C, Lu M, Walk SF, Tosello-Tramont AC, Macara IG, Madhani H, Fink GR, Ravichandran KS: **Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex.** *Nat Cell Biol* 2002, **4**(8):574-582.
109. Cote JF, Vuori K: **Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity.** *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 24):4901-4913.
110. Shinohara M, Terada Y, Iwamatsu A, Shinohara A, Mochizuki N, Higuchi M, Gotoh Y, Ihara S, Nagata S, Itoh H *et al*: **SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling.** *Nature* 2002, **416**(6882):759-763.
111. Erickson JW, Cerione RA: **Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes.** *Biochemistry* 2004, **43**(4):837-842.
112. Hoffman GR, Cerione RA: **Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain.** *FEBS Lett* 2002, **513**(1):85-91.
113. Moon SY, Zheng Y: **Rho GTPase-activating proteins in cell regulation.** *Trends Cell Biol* 2003, **13**(1):13-22.
114. Kandpal RP: **Rho GTPase activating proteins in cancer phenotypes.** *Curr Protein Pept Sci* 2006, **7**(4):355-365.
115. Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Lim L, Hall A: **Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac.** *Nature* 1991, **351**(6325):400-402.
116. Gamblin SJ, Smerdon SJ: **GTPase-activating proteins and their complexes.** *Curr Opin Struct Biol* 1998, **8**(2):195-201.
117. Bernards A, Settleman J: **GAP control: regulating the regulators of small GTPases.** *Trends Cell Biol* 2004, **14**(7):377-385.
118. Ohga N, Kikuchi A, Ueda T, Yamamoto J, Takai Y: **Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of**

- GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989, **163**(3):1523-1533.
119. Ueda T, Kikuchi A, Ohga N, Yamamoto J, Takai Y: **Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein.** *J Biol Chem* 1990, **265**(16):9373-9380.
 120. Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, Guillemot JC, Khagad M, Caput D, Lim B: **cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(4):1479-1483.
 121. Adra CN, Manor D, Ko JL, Zhu S, Horiuchi T, Van Aelst L, Cerione RA, Lim B: **RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(9):4279-4284.
 122. Zalzman G, Closson V, Camonis J, Honore N, Rousseau-Merck MF, Tavitian A, Olofsson B: **RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG.** *J Biol Chem* 1996, **271**(48):30366-30374.
 123. Dovas A, Couchman JR: **RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities.** *Biochem J* 2005, **390**(Pt 1):1-9.
 124. Hori Y, Kikuchi A, Isomura M, Katayama M, Miura Y, Fujioka H, Kaibuchi K, Takai Y: **Post-translational modifications of the C-terminal region of the rho protein are important for its interaction with membranes and the stimulatory and inhibitory GDP/GTP exchange proteins.** *Oncogene* 1991, **6**(4):515-522.
 125. Isomura M, Kikuchi A, Ohga N, Takai Y: **Regulation of binding of rhoB p20 to membranes by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor.** *Oncogene* 1991, **6**(1):119-124.
 126. Olofsson B: **Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling.** *Cell Signal* 1999, **11**(8):545-554.
 127. Dransart E, Morin A, Cherfils J, Olofsson B: **Uncoupling of inhibitory and shuttling functions of rho GDP dissociation inhibitors.** *J Biol Chem* 2005, **280**(6):4674-4683.
 128. Chuang TH, Xu X, Knaus UG, Hart MJ, Bokoch GM: **GDP dissociation inhibitor prevents intrinsic and GTPase activating protein-stimulated GTP hydrolysis by the Rac GTP-binding protein.** *J Biol Chem* 1993, **268**(2):775-778.
 129. Sasaki T, Kato M, Takai Y: **Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21.** *J Biol Chem* 1993, **268**(32):23959-23963.
 130. Boulter E, Garcia-Mata R, Guilluy C, Dubash A, Rossi G, Brennwald PJ, Burridge K: **Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1.** *Nat Cell Biol*, **12**(5):477-483.
 131. Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J: **Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes.** *Embo J* 1996, **15**(3):510-519.
 132. DerMardirossian C, Rocklin G, Seo JY, Bokoch GM: **Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling.** *Mol Biol Cell* 2006, **17**(11):4760-4768.
 133. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T: **Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion.** *Cancer Metastasis Rev* 2009, **28**(1-2):65-76.
 134. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM: **GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo.** *Bioessays* 2007, **29**(4):356-370.

135. Ridley AJ, Hall A: **The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors.** *Cell* 1992, **70**(3):389-399.
136. Nobes CD, Hall A: **Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility.** *Biochem Soc Trans* 1995, **23**(3):456-459.
137. Nobes CD, Hall A: **Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia.** *Cell* 1995, **81**(1):53-62.
138. Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S: **Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization.** *Nat Cell Biol* 1999, **1**(3):136-143.
139. Bishop AL, Hall A: **Rho GTPases and their effector proteins.** *Biochem J* 2000, **348 Pt 2**:241-255.
140. Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ: **RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(8):4761-4771.
141. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P: **A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion.** *J Cell Biol* 1998, **141**(1):187-197.
142. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: **Cell migration: integrating signals from front to back.** *Science* 2003, **302**(5651):1704-1709.
143. Etienne-Manneville S, Hall A: **Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta.** *Cell* 2001, **106**(4):489-498.
144. Caron E, Hall A: **Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases.** *Science* 1998, **282**(5394):1717-1721.
145. Qualmann B, Mellor H: **Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases.** *Biochem J* 2003, **371**(Pt 2):233-241.
146. Ellis S, Mellor H: **Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases.** *Trends Cell Biol* 2000, **10**(3):85-88.
147. Benitah SA, Valeron PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC: **Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1705**(2):121-132.
148. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS: **The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway.** *Cell* 1995, **81**(7):1137-1146.
149. Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M: **Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs.** *Cell* 1995, **81**(7):1147-1157.
150. Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Gutkind JS: **Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family.** *J Biol Chem* 1996, **271**(44):27225-27228.
151. Yamamoto M, Marui N, Sakai T, Morii N, Kozaki S, Ikai K, Imamura S, Narumiya S: **ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle.** *Oncogene* 1993, **8**(6):1449-1455.
152. Olson MF, Ashworth A, Hall A: **An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1.** *Science* 1995, **269**(5228):1270-1272.
153. Coleman ML, Marshall CJ, Olson MF: **RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**(5):355-366.

154. Welsh CF: **Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in g1 cell cycle regulation.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **84**(1):33-42.
155. Adnane J, Bizouarn FA, Qian Y, Hamilton AD, Sebti SM: **p21(WAF1/CIP1) is upregulated by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298 through a transforming growth factor beta- and Sp1-responsive element: involvement of the small GTPase rhoA.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(12):6962-6970.
156. Hirai A, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Tatsuno I, Oeda T, Tahara K, Terano T, Narumiya S *et al*: **Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells.** *J Biol Chem* 1997, **272**(1):13-16.
157. Esteve P, Embade N, Perona R, Jimenez B, del Peso L, Leon J, Arends M, Miki T, Lacal JC: **Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway.** *Oncogene* 1998, **17**(14):1855-1869.
158. Brenner B, Koppenhoefer U, Weinstock C, Linderkamp O, Lang F, Gulbins E: **Fas- or ceramide-induced apoptosis is mediated by a Rac1-regulated activation of Jun N-terminal kinase/p38 kinases and GADD153.** *J Biol Chem* 1997, **272**(35):22173-22181.
159. Fritz G, Kaina B: **Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000, **268**(3):784-789.
160. Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC: **RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells.** *Mol Cell Biol* 2001, **21**(20):6906-6912.
161. Prendergast GC: **Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis.** *Nat Rev Cancer* 2001, **1**(2):162-168.
162. Joneson T, Bar-Sagi D: **Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(9):5892-5901.
163. Pervaiz S, Cao J, Chao OS, Chin YY, Clement MV: **Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells.** *Oncogene* 2001, **20**(43):6263-6268.
164. Sahai E, Marshall CJ: **RHO-GTPases and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(2):133-142.
165. Ridley AJ: **Rho proteins and cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **84**(1):13-19.
166. Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C: **Rho GTPase function in tumorigenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1796**(2):91-98.
167. Vega FM, Ridley AJ: **Rho GTPases in cancer cell biology.** *FEBS Lett* 2008, **582**(14):2093-2101.
168. Prendergast GC, Khosravi-Far R, Solski PA, Kurzawa H, Lebowitz PF, Der CJ: **Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras.** *Oncogene* 1995, **10**(12):2289-2296.
169. Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoine D, Lai JL, Daudignon A, Adenis C, Bauters F, Fenaux P *et al*: **Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.** *Oncogene* 2000, **19**(16):2023-2032.
170. Fiegen D, Haeusler LC, Blumenstein L, Herbrand U, Dvorsky R, Vetter IR, Ahmadian MR: **Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase.** *J Biol Chem* 2004, **279**(6):4743-4749.
171. Jordan P, Brazao R, Boavida MG, Gespach C, Chastre E: **Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors.** *Oncogene* 1999, **18**(48):6835-6839.

172. Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG: **Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(1):185-189.
173. Suwa H, Ohshio G, Imamura T, Watanabe G, Arii S, Imamura M, Narumiya S, Hiai H, Fukumoto M: **Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas.** *Br J Cancer* 1998, **77**(1):147-152.
174. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO: **Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC.** *Nature* 2000, **406**(6795):532-535.
175. Kamai T, Arai K, Tsujii T, Honda M, Yoshida K: **Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour.** *BJU Int* 2001, **87**(3):227-231.
176. Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K: **Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(14):4799-4805.
177. Jaffe AB, Hall A: **Rho GTPases in transformation and metastasis.** *Adv Cancer Res* 2002, **84**:57-80.
178. Quinlan MP: **Rac regulates the stability of the adherens junction and its components, thus affecting epithelial cell differentiation and transformation.** *Oncogene* 1999, **18**(47):6434-6442.
179. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL: **Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism.** *Mol Biol Cell* 2001, **12**(1):27-36.
180. Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE: **Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression.** *J Biol Chem* 2001, **276**(45):41889-41897.
181. Zhuge Y, Xu J: **Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier.** *J Biol Chem* 2001, **276**(19):16248-16256.
182. van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao L, Merajver SD: **RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells.** *Neoplasia* 2000, **2**(5):418-425.
183. Collisson EA, Kler C, Wu M, De A, Gambhir SS, Merajver SD, Kolodney MS: **Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells.** *Mol Cancer Ther* 2003, **2**(10):941-948.
184. Hakem A, Sanchez-Sweatman O, You-Ten A, Duncan G, Wakeham A, Khokha R, Mak TW: **RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis.** *Genes Dev* 2005, **19**(17):1974-1979.
185. Hamaguchi M, Meth JL, von Klitzing C, Wei W, Esposito D, Rodgers L, Walsh T, Welsh P, King MC, Wigler MH: **DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(21):13647-13652.
186. Bektic J, Pfeil K, Berger AP, Ramoner R, Pelzer A, Schafer G, Kofler K, Bartsch G, Klocker H: **Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis.** *Prostate* 2005, **64**(4):332-340.
187. Harding MA, Theodorescu D: **RhoGDI signaling provides targets for cancer therapy.** *Eur J Cancer*, **46**(7):1252-1259.
188. Bellizzi A, Mangia A, Chiriatti A, Petroni S, Quaranta M, Schittulli F, Malfettone A, Cardone RA, Paradiso A, Reshkin SJ: **RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease.** *Int J Mol Med* 2008, **22**(1):25-31.

189. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA: **A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.** *Cell* 2009, **137**(6):1032-1046.
190. Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY, Wu J, Nakayama KI, Kang HY, Huang HY *et al*: **Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis.** *Nat Cell Biol*, **12**(5):457-467.
191. Oviedo PJ, Sobrino A, Laguna-Fernandez A, Novella S, Tarin JJ, Garcia-Perez MA, Sanchis J, Cano A, Hermenegildo C: **Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway.** *Mol Cell Endocrinol*.
192. Fritz G, Gnad R, Kaina B: **Cell and tissue-type specific expression of Ras-related GTPase RhoB.** *Anticancer Res* 1999, **19**(3A):1681-1688.
193. Jiang WG, Watkins G, Lane J, Cunnick GH, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE: **Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(17):6432-6440.
194. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H *et al*: **Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase.** *Science* 1995, **270**(5241):1491-1494.
195. Su LF, Knoblauch R, Garabedian MJ: **Rho GTPases as modulators of the estrogen receptor transcriptional response.** *J Biol Chem* 2001, **276**(5):3231-3237.
196. Doisneau-Sixou SF, Cestac P, Chouini S, Carroll JS, Hamilton AD, Sebti SM, Poirot M, Balaguer P, Faye JC, Sutherland RL *et al*: **Contrasting effects of prenyltransferase inhibitors on estrogen-dependent cell cycle progression and estrogen receptor-mediated transcriptional activity in MCF-7 cells.** *Endocrinology* 2003, **144**(3):989-998.
197. Cestac P, Sarrabayrouse G, Medale-Giamarchi C, Roचाix P, Balaguer P, Favre G, Faye JC, Doisneau-Sixou S: **Prenylation inhibitors stimulate both estrogen receptor alpha transcriptional activity through AF-1 and AF-2 and estrogen receptor beta transcriptional activity.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(1):R60-70.
198. van Golen KL, Davies S, Wu ZF, Wang Y, Bucana CD, Root H, Chandrasekharappa S, Strawderman M, Ethier SP, Merajver SD: **A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**(9):2511-2519.
199. van Golen KL, Bao LW, Pan Q, Miller FR, Wu ZF, Merajver SD: **Mitogen activated protein kinase pathway is involved in RhoC GTPase induced motility, invasion and angiogenesis in inflammatory breast cancer.** *Clin Exp Metastasis* 2002, **19**(4):301-311.
200. Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF, Merajver SD: **WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2004, **6**(2):R110-115.
201. van Golen KL, Bao L, DiVito MM, Wu Z, Prendergast GC, Merajver SD: **Reversion of RhoC GTPase-induced inflammatory breast cancer phenotype by treatment with a farnesyl transferase inhibitor.** *Mol Cancer Ther* 2002, **1**(8):575-583.
202. Lin M, van Golen KL: **Rho-regulatory proteins in breast cancer cell motility and invasion.** *Breast Cancer Res Treat* 2004, **84**(1):49-60.
203. Kleer CG, van Golen KL, Zhang Y, Wu ZF, Rubin MA, Merajver SD: **Characterization of RhoC expression in benign and malignant breast disease: a**

- potential new marker for small breast carcinomas with metastatic ability.** *Am J Pathol* 2002, **160**(2):579-584.
204. Wu M, Wu ZF, Rosenthal DT, Rhee EM, Merajver SD: **Characterization of the roles of RHOC and RHOA GTPases in invasion, motility, and matrix adhesion in inflammatory and aggressive breast cancers.** *Cancer*, **116**(11 Suppl):2768-2782.
 205. Lane J, Martin TA, Mansel RE, Jiang WG: **The expression and prognostic value of the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) Trio, Vav1 and TIAM-1 in human breast cancer.** *Int Semin Surg Oncol* 2008, **5**:23.
 206. Wu D, Asiedu M, Wei Q: **Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC.** *Oncogene* 2009, **28**(22):2219-2230.
 207. Rubino D, Driggers P, Arbit D, Kemp L, Miller B, Coso O, Pagliai K, Gray K, Gutkind S, Segars J: **Characterization of Brx, a novel Dbl family member that modulates estrogen receptor action.** *Oncogene* 1998, **16**(19):2513-2526.
 208. Shen CH, Chen HY, Lin MS, Li FY, Chang CC, Kuo ML, Settleman J, Chen RH: **Breast tumor kinase phosphorylates p190RhoGAP to regulate rho and ras and promote breast carcinoma growth, migration, and invasion.** *Cancer Res* 2008, **68**(19):7779-7787.
 209. Zhang Y, Zhang B: **D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness.** *Cancer Res* 2006, **66**(11):5592-5598.
 210. El Marzouk S, Schultz-Norton JR, Likhite VS, McLeod IX, Yates JR, Nardulli AM: **Rho GDP dissociation inhibitor alpha interacts with estrogen receptor alpha and influences estrogen responsiveness.** *J Mol Endocrinol* 2007, **39**(4):249-259.
 211. Reiss Y, Goldstein JL, Seabra MC, Casey PJ, Brown MS: **Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides.** *Cell* 1990, **62**(1):81-88.
 212. Leonard DM: **Ras farnesyltransferase: a new therapeutic target.** *J Med Chem* 1997, **40**(19):2971-2990.
 213. Manne V, Yan N, Carboni JM, Tuomari AV, Ricca CS, Brown JG, Andahazy ML, Schmidt RJ, Patel D, Zahler R *et al*: **Bisubstrate inhibitors of farnesyltransferase: a novel class of specific inhibitors of ras transformed cells.** *Oncogene* 1995, **10**(9):1763-1779.
 214. Doisneau-Sixou SF, Cestac P, Faye JC, Favre G, Sutherland RL: **Additive effects of tamoxifen and the farnesyl transferase inhibitor FTI-277 on inhibition of MCF-7 breast cancer cell-cycle progression.** *Int J Cancer* 2003, **106**(5):789-798.
 215. Dalenc F, Giamarchi C, Petit M, Poirot M, Favre G, Faye JC: **Farnesyl-transferase inhibitor R115,777 enhances tamoxifen inhibition of MCF-7 cell growth through estrogen receptor dependent and independent pathways.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(6):R1159-1167.
 216. Sparano JA, Moulder S, Kazi A, Coppola D, Negassa A, Vahdat L, Li T, Pellegrino C, Fineberg S, Munster P *et al*: **Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(8):2942-2948.
 217. Cohen-Jonathan E, Toulas C, Ader I, Monteil S, Allal C, Bonnet J, Hamilton AD, Sebti SM, Daly-Schveitzer N, Favre G: **The farnesyltransferase inhibitor FTI-277 suppresses the 24-kDa FGF2-induced radioresistance in HeLa cells expressing wild-type RAS.** *Radiat Res* 1999, **152**(4):404-411.
 218. Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, Favre G: **RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death.** *Oncogene* 2002, **21**(39):5998-6006.

219. Cannizzaro LA, Madaule P, Hecht F, Axel R, Croce CM, Huebner K: **Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family.** *Genomics* 1990, **6**(2):197-203.
220. Prendergast GC, Rane N: **Farnesyltransferase inhibitors: mechanism and applications.** *Expert Opin Investig Drugs* 2001, **10**(12):2105-2116.
221. Fritz G, Kaina B, Aktories K: **The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments.** *J Biol Chem* 1995, **270**(42):25172-25177.
222. Canguilhem B, Pradines A, Baudouin C, Boby C, Lajoie-Mazenc I, Charveron M, Favre G: **RhoB protects human keratinocytes from UVB-induced apoptosis through epidermal growth factor receptor signaling.** *J Biol Chem* 2005, **280**(52):43257-43263.
223. de Cremoux P, Gauville C, Closson V, Linares G, Calvo F, Tavitian A, Olofsson B: **EGF modulation of the ras-related rhoB gene expression in human breast-cancer cell lines.** *Int J Cancer* 1994, **59**(3):408-415.
224. Malcolm T, Ettahadieh E, Sadowski I: **Mitogen-responsive expression of RhoB is regulated by RNA stability.** *Oncogene* 2003, **22**(40):6142-6150.
225. Moustakas A, Stournaras C: **Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts.** *J Cell Sci* 1999, **112** (Pt 8):1169-1179.
226. Engel ME, Datta PK, Moses HL: **RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation.** *J Biol Chem* 1998, **273**(16):9921-9926.
227. Xie L, Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA, Moses HL: **Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line.** *Breast Cancer Res* 2003, **5**(6):R187-198.
228. Fritz G, Kaina B: **rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase.** *J Biol Chem* 1997, **272**(49):30637-30644.
229. Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV, Deroanne CF: **RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha.** *J Biol Chem* 2008, **283**(31):21588-21598.
230. Fritz G, Kaina B: **Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(3):792-798.
231. Westmark CJ, Bartleson VB, Malter JS: **RhoB mRNA is stabilized by HuR after UV light.** *Oncogene* 2005, **24**(3):502-511.
232. Chen YX, Li ZB, Diao F, Cao DM, Fu CC, Lu J: **Up-regulation of RhoB by glucocorticoids and its effects on the cell proliferation and NF-kappaB transcriptional activity.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006, **101**(4-5):179-187.
233. Adamson P, Marshall CJ, Hall A, Tilbrook PA: **Post-translational modifications of p21rho proteins.** *J Biol Chem* 1992, **267**(28):20033-20038.
234. Baron R, Fourcade E, Lajoie-Mazenc I, Allal C, Couderc B, Barbaras R, Favre G, Faye JC, Pradines A: **RhoB prenylation is driven by the three carboxyl-terminal amino acids of the protein: evidenced in vivo by an anti-farnesyl cysteine antibody.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**(21):11626-11631.
235. Armstrong SA, Hannah VC, Goldstein JL, Brown MS: **CAAX geranylgeranyl transferase transfers farnesyl as efficiently as geranylgeranyl to RhoB.** *J Biol Chem* 1995, **270**(14):7864-7868.

236. Lebowitz PF, Du W, Prendergast GC: **Prenylation of RhoB is required for its cell transforming function but not its ability to activate serum response element-dependent transcription.** *J Biol Chem* 1997, **272**(26):16093-16095.
237. Wherlock M, Gampel A, Futter C, Mellor H: **Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 15):3221-3231.
238. Wang R, Cherukuri P, Luo J: **Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(12):11528-11534.
239. Arthur WT, Ellerbroek SM, Der CJ, Burridge K, Wennerberg K: **XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC.** *J Biol Chem* 2002, **277**(45):42964-42972.
240. Gampel A, Mellor H: **Small interfering RNAs as a tool to assign Rho GTPase exchange-factor function in vivo.** *Biochem J* 2002, **366**(Pt 2):393-398.
241. Schuebel KE, Movilla N, Rosa JL, Bustelo XR: **Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2.** *Embo J* 1998, **17**(22):6608-6621.
242. Mohl M, Winkler S, Wieland T, Lutz S: **Gef10--the third member of a Rho-specific guanine nucleotide exchange factor subfamily with unusual protein architecture.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006, **373**(5):333-341.
243. Bilodeau D, Lamy S, Desrosiers RR, Gingras D, Beliveau R: **Regulation of Rho protein binding to membranes by rhoGDI: inhibition of releasing activity by physiological ionic conditions.** *Biochem Cell Biol* 1999, **77**(1):59-69.
244. Brunet N, Morin A, Olofsson B: **RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain.** *Traffic* 2002, **3**(5):342-357.
245. Wheeler AP, Ridley AJ: **Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility.** *Exp Cell Res* 2004, **301**(1):43-49.
246. Flynn P, Mellor H, Palmer R, Panayotou G, Parker PJ: **Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif.** *J Biol Chem* 1998, **273**(5):2698-2705.
247. Maesaki R, Ihara K, Shimizu T, Kuroda S, Kaibuchi K, Hakoshima T: **The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1.** *Mol Cell* 1999, **4**(5):793-803.
248. Owen D, Lowe PN, Nietlispach D, Brosnan CE, Chirgadze DY, Parker PJ, Blundell TL, Mott HR: **Molecular dissection of the interaction between the small G proteins Rac1 and RhoA and protein kinase C-related kinase 1 (PRK1).** *J Biol Chem* 2003, **278**(50):50578-50587.
249. Palmer RH, Ridden J, Parker PJ: **Identification of multiple, novel, protein kinase C-related gene products.** *FEBS Lett* 1994, **356**(1):5-8.
250. Mukai H, Ono Y: **A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C.** *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **199**(2):897-904.
251. Mellor H, Flynn P, Nobes CD, Hall A, Parker PJ: **PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB.** *J Biol Chem* 1998, **273**(9):4811-4814.
252. Gampel A, Parker PJ, Mellor H: **Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB.** *Curr Biol* 1999, **9**(17):955-958.
253. Flynn P, Mellor H, Casamassima A, Parker PJ: **Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**(15):11064-11070.

254. Zeng PY, Rane N, Du W, Chintapalli J, Prendergast GC: **Role for RhoB and PRK in the suppression of epithelial cell transformation by farnesyltransferase inhibitors.** *Oncogene* 2003, **22**(8):1124-1134.
255. Mircescu H, Steuve S, Savonet V, Degraef C, Mellor H, Dumont JE, Maenhaut C, Pirson I: **Identification and characterization of a novel activated RhoB binding protein containing a PDZ domain whose expression is specifically modulated in thyroid cells by cAMP.** *Eur J Biochem* 2002, **269**(24):6241-6249.
256. Wallar BJ, Deward AD, Resau JH, Alberts AS: **RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking.** *Exp Cell Res* 2007, **313**(3):560-571.
257. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM, Favre G: **Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298.** *Cell Cycle* 2002, **1**(6):430-437.
258. Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C: **LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta.** *J Biol Chem* 2005, **280**(12):11448-11457.
259. Ishida H, Zhang X, Erickson K, Ray P: **Botulinum toxin type A targets RhoB to inhibit lysophosphatidic acid-stimulated actin reorganization and acetylcholine release in nerve growth factor-treated PC12 cells.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **310**(3):881-889.
260. Leung MK, Jones T, Michels CL, Livingston DM, Bhattacharya S: **Molecular cloning and chromosomal localization of the human CITED2 gene encoding p35srj/Mrg1.** *Genomics* 1999, **61**(3):307-313.
261. Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE: **RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development.** *Genes Dev* 2003, **17**(21):2721-2732.
262. Huang M, Kamasani U, Prendergast GC: **RhoB facilitates c-Myc turnover by supporting efficient nuclear accumulation of GSK-3.** *Oncogene* 2006, **25**(9):1281-1289.
263. Wheeler AP, Ridley AJ: **RhoB affects macrophage adhesion, integrin expression and migration.** *Exp Cell Res* 2007, **313**(16):3505-3516.
264. Bousquet E, Mazieres J, Privat M, Rizzati V, Casanova A, Ledoux A, Mery E, Couderc B, Favre G, Pradines A: **Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1.** *Cancer Res* 2009, **69**(15):6092-6099.
265. Monferran S, Skuli N, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Cohen-Jonathan-Moyal E, Toulas C: **Alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB.** *Int J Cancer* 2008, **123**(2):357-364.
266. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Favre G, Bonnet J, Toulas C, Cohen-Jonathan Moyal E: **Alphavbeta3/alphavbeta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma.** *Cancer Res* 2009, **69**(8):3308-3316.
267. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebti S: **Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(12):5565-5576.
268. Mazieres J, Tillement V, Allal C, Clanet C, Bobin L, Chen Z, Sebti SM, Favre G, Pradines A: **Geranylgeranylated, but not farnesylated, RhoB suppresses Ras transformation of NIH-3T3 cells.** *Exp Cell Res* 2005, **304**(2):354-364.
269. Skuli N, Monferran S, Delmas C, Lajoie-Mazenc I, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E: **Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible**

- factor-1alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells.** *Cancer Res* 2006, **66**(1):482-489.
270. Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, End D, Bonnet J, Favre G, Toulas C: **Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation.** *Int J Cancer* 2002, **100**(1):43-48.
271. Ader I, Delmas C, Bonnet J, Rochaix P, Favre G, Toulas C, Cohen-Jonathan-Moyal E: **Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts.** *Oncogene* 2003, **22**(55):8861-8869.
272. Allal C, Favre G, Couderc B, Salicio S, Sixou S, Hamilton AD, Sebti SM, Lajoie-Mazenc I, Pradines A: **RhoA prenylation is required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription.** *J Biol Chem* 2000, **275**(40):31001-31008.
273. Lebowitz PF, Casey PJ, Prendergast GC, Thissen JA: **Farnesyltransferase inhibitors alter the prenylation and growth-stimulating function of RhoB.** *J Biol Chem* 1997, **272**(25):15591-15594.
274. Fritz G, Kaina B: **Ras-related GTPase RhoB represses NF-kappaB signaling.** *J Biol Chem* 2001, **276**(5):3115-3122.
275. Adnane J, Muro-Cacho C, Mathews L, Sebti SM, Munoz-Antonia T: **Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients.** *Clin Cancer Res* 2002, **8**(7):2225-2232.
276. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC: **Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB.** *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3):1831-1840.
277. Delarue FL, Taylor BS, Sebti SM: **Ras and RhoA suppress whereas RhoB enhances cytokine-induced transcription of nitric oxide synthase-2 in human normal liver AKN-1 cells and lung cancer A-549 cells.** *Oncogene* 2001, **20**(45):6531-6537.
278. Shi Q, Hjelmeland AB, Keir ST, Song L, Wickman S, Jackson D, Ohmori O, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN: **A novel low-molecular weight inhibitor of focal adhesion kinase, TAE226, inhibits glioma growth.** *Mol Carcinog* 2007, **46**(6):488-496.
279. Shao H, Andres DA: **A novel RalGEF-like protein, RGL3, as a candidate effector for rit and Ras.** *J Biol Chem* 2000, **275**(35):26914-26924.
280. Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Soria E, Lamas S: **Involvement of Rho GTPases in the transcriptional inhibition of preproendothelin-1 gene expression by simvastatin in vascular endothelial cells.** *Circ Res* 2000, **87**(7):616-622.
281. Prendergast GC, Oliff A: **Farnesyltransferase inhibitors: antineoplastic properties, mechanisms of action, and clinical prospects.** *Semin Cancer Biol* 2000, **10**(6):443-452.
282. Chen Z, Sun J, Pradines A, Favre G, Adnane J, Sebti SM: **Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice.** *J Biol Chem* 2000, **275**(24):17974-17978.
283. Mazieres J, Antonia T, Daste G, Muro-Cacho C, Berchery D, Tillement V, Pradines A, Sebti S, Favre G: **Loss of RhoB expression in human lung cancer progression.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(8):2742-2750.
284. Wang S, Yan-Neale Y, Fischer D, Zeremski M, Cai R, Zhu J, Asselbergs F, Hampton G, Cohen D: **Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line.** *Oncogene* 2003, **22**(40):6204-6213.
285. Forget MA, Desrosiers RR, Del M, Moumdjian R, Shedid D, Berthelet F, Beliveau R: **The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers.** *Clin Exp Metastasis* 2002, **19**(1):9-15.

286. Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H: **Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer.** *Clin Cancer Res* 2003, **9**(7):2632-2641.
287. Tovar D, Faye JC, Favre G: **Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity.** *Genomics* 2003, **81**(5):525-530.
288. Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, Norman JC, Superti-Furga G, Frame MC: **RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane.** *Dev Cell* 2004, **7**(6):855-869.
289. Jiang K, Coppola D, Crespo NC, Nicosia SV, Hamilton AD, Sebt SM, Cheng JQ: **The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(1):139-148.
290. Chen G, Hitomi M, Han J, Stacey DW: **The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling.** *J Biol Chem* 2000, **275**(50):38973-38980.
291. Kamasani U, Liu AX, Prendergast GC: **Genetic response to farnesyltransferase inhibitors: proapoptotic targets of RhoB.** *Cancer Biol Ther* 2003, **2**(3):273-280.
292. Kamasani U, Huang M, Duhadaway JB, Prochownik EV, Donover PS, Prendergast GC: **Cyclin B1 is a critical target of RhoB in the cell suicide program triggered by farnesyl transferase inhibition.** *Cancer Res* 2004, **64**(22):8389-8396.
293. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN: **The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(1):32-42.
294. Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkuhler C: **HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics.** *Cell Res* 2007, **17**(3):195-211.
295. Ling L, Lobie PE: **RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription.** *J Biol Chem* 2004, **279**(31):32737-32750.
296. Ropero S, Esteller M: **The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer.** *Mol Oncol* 2007, **1**(1):19-25.
297. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE: **Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964, **51**:786-794.
298. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: **A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p.** *Science* 1996, **272**(5260):408-411.
299. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP: **Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.** *Nature* 1999, **401**(6749):188-193.
300. Suzuki T: **Explorative study on isoform-selective histone deacetylase inhibitors.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2009, **57**(9):897-906.
301. Lassen U, Molife LR, Sorensen M, Engelholm SA, Vidal L, Sinha R, Penson RT, Buhl-Jensen P, Crowley E, Tjornelund J *et al*: **A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the histone deacetylase inhibitor belinostat administered in combination with carboplatin and/or paclitaxel in patients with solid tumours.** *Br J Cancer*, **103**(1):12-17.
302. Piekarczyk RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, Zain J, Prince HM, Leonard JP, Geskin LJ *et al*: **Phase II multi-institutional trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin as monotherapy for patients with cutaneous T-cell lymphoma.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(32):5410-5417.

303. Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D: **Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents.** *J Hematol Oncol*, **3**:5.
304. Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB: **Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials.** *Drugs* 2009, **69**(14):1911-1934.
305. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T *et al*: **Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity.** *J Biol Chem* 2001, **276**(21):18375-18383.
306. Kawai H, Li H, Avraham S, Jiang S, Avraham HK: **Overexpression of histone deacetylase HDAC1 modulates breast cancer progression by negative regulation of estrogen receptor alpha.** *Int J Cancer* 2003, **107**(3):353-358.
307. Castet A, Boulahtouf A, Versini G, Bonnet S, Augereau P, Vignon F, Khochbin S, Jalaguier S, Cavailles V: **Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**(6):1957-1966.
308. Fischle W, Dequiedt F, Hendzel MJ, Guenther MG, Lazar MA, Voelter W, Verdin E: **Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR.** *Mol Cell* 2002, **9**(1):45-57.
309. Suzuki J, Chen YY, Scott GK, Devries S, Chin K, Benz CC, Waldman FM, Hwang ES: **Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(9):3163-3171.
310. Inoue A, Yoshida N, Omoto Y, Oguchi S, Yamori T, Kiyama R, Hayashi S: **Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes.** *J Mol Endocrinol* 2002, **29**(2):175-192.
311. Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M *et al*: **Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer.** *Oncogene* 2005, **24**(28):4531-4539.
312. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H: **Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **94**(1):11-16.
313. Krusche CA, Wulfing P, Kersting C, Vloet A, Bocker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J: **Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **90**(1):15-23.
314. Fishman J, Osborne MP, Telang NT: **The role of estrogen in mammary carcinogenesis.** *Ann N Y Acad Sci* 1995, **768**:91-100.
315. Hortobagyi GN: **Treatment of breast cancer.** *N Engl J Med* 1998, **339**(14):974-984.
316. Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, Davidson NE: **Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors.** *Clin Cancer Res* 1996, **2**(5):805-810.
317. Sharma D, Saxena NK, Davidson NE, Vertino PM: **Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes.** *Cancer Res* 2006, **66**(12):6370-6378.
318. Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE: **Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression.** *Cancer Res* 1995, **55**(11):2279-2283.
319. Ferguson AT, Vertino PM, Spitzner JR, Baylin SB, Muller MT, Davidson NE: **Role of estrogen receptor gene demethylation and DNA methyltransferase.DNA adduct**

- formation in 5-aza-2'-deoxycytidine-induced cytotoxicity in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1997, **272**(51):32260-32266.
320. Keen JC, Yan L, Mack KM, Pettit C, Smith D, Sharma D, Davidson NE: **A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine.** *Breast Cancer Res Treat* 2003, **81**(3):177-186.
321. Sharma D, Blum J, Yang X, Beaulieu N, Macleod AR, Davidson NE: **Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the Estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells.** *Mol Endocrinol* 2005, **19**(7):1740-1751.
322. Zhou Q, Atadja P, Davidson NE: **Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation.** *Cancer Biol Ther* 2007, **6**(1):64-69.
323. Zhou Q, Shaw PG, Davidson NE: **Inhibition of histone deacetylase suppresses EGF signaling pathways by destabilizing EGFR mRNA in ER-negative human breast cancer cells.** *Breast Cancer Res Treat* 2009, **117**(2):443-451.
324. Hirokawa Y, Arnold M, Nakajima H, Zalcborg J, Maruta H: **Signal therapy of breast cancers by the HDAC inhibitor FK228 that blocks the activation of PAK1 and abrogates the tamoxifen-resistance.** *Cancer Biol Ther* 2005, **4**(9):956-960.
325. Fortunati N, Bertino S, Costantino L, De Bortoli M, Compagnone A, Bandino A, Catalano MG, Bocuzzi G: **Valproic acid restores ER alpha and antiestrogen sensitivity to ER alpha-negative breast cancer cells.** *Mol Cell Endocrinol*, **314**(1):17-22.
326. Reid G, Metivier R, Lin CY, Denger S, Ibberson D, Ivancevic T, Brand H, Benes V, Liu ET, Gannon F: **Multiple mechanisms induce transcriptional silencing of a subset of genes, including oestrogen receptor alpha, in response to deacetylase inhibition by valproic acid and trichostatin A.** *Oncogene* 2005, **24**(31):4894-4907.
327. Rocha W, Sanchez R, Deschenes J, Auger A, Hebert E, White JH, Mader S: **Opposite effects of histone deacetylase inhibitors on glucocorticoid and estrogen signaling in human endometrial Ishikawa cells.** *Mol Pharmacol* 2005, **68**(6):1852-1862.
328. Alao JP, Lam EW, Ali S, Buluwela L, Bordogna W, Lockey P, Varshochi R, Stavropoulou AV, Coombes RC, Vigushin DM: **Histone deacetylase inhibitor trichostatin A represses estrogen receptor alpha-dependent transcription and promotes proteasomal degradation of cyclin D1 in human breast carcinoma cell lines.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(23):8094-8104.
329. Yi X, Wei W, Wang SY, Du ZY, Xu YJ, Yu XD: **Histone deacetylase inhibitor SAHA induces ERalpha degradation in breast cancer MCF-7 cells by CHIP-mediated ubiquitin pathway and inhibits survival signaling.** *Biochem Pharmacol* 2008, **75**(9):1697-1705.
330. Bicaku E, Marchion DC, Schmitt ML, Munster PN: **Selective inhibition of histone deacetylase 2 silences progesterone receptor-mediated signaling.** *Cancer Res* 2008, **68**(5):1513-1519.
331. Travaglini L, Vian L, Billi M, Grignani F, Nervi C: **Epigenetic reprogramming of breast cancer cells by valproic acid occurs regardless of estrogen receptor status.** *Int J Biochem Cell Biol* 2009, **41**(1):225-234.
332. Duong V, Licznar A, Margueron R, Boulle N, Busson M, Lacroix M, Katzenellenbogen BS, Cavailles V, Lazennec G: **ERalpha and ERbeta expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors.** *Oncogene* 2006, **25**(12):1799-1806.

333. Duong V, Bret C, Altucci L, Mai A, Duraffourd C, Loubersac J, Harmand PO, Bonnet S, Valente S, Maudelonde T *et al*: **Specific activity of class II histone deacetylases in human breast cancer cells.** *Mol Cancer Res* 2008, **6**(12):1908-1919.
334. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P *et al*: **Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors.** *J Biol Chem* 2005, **280**(29):26729-26734.
335. Duong BN, Elliott S, Frigo DE, Melnik LI, Vanhoy L, Tomchuck S, Lebeau HP, David O, Beckman BS, Alam J *et al*: **AKT regulation of estrogen receptor beta transcriptional activity in breast cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**(17):8373-8381.
336. Munster P, Marchion D, Bicaku E, Lacevic M, Kim J, Centeno B, Daud A, Neuger A, Minton S, Sullivan D: **Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**(7):2488-2496.
337. Yang X, Phillips DL, Ferguson AT, Nelson WG, Herman JG, Davidson NE: **Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells.** *Cancer Res* 2001, **61**(19):7025-7029.
338. Fan J, Yin WJ, Lu JS, Wang L, Wu J, Wu FY, Di GH, Shen ZZ, Shao ZM: **ER alpha negative breast cancer cells restore response to endocrine therapy by combination treatment with both HDAC inhibitor and DNMT inhibitor.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2008, **134**(8):883-890.
339. Hostetter CL, Licata LA, Keen JC: **Timing is everything: order of administration of 5-aza 2' deoxycytidine, trichostatin A and tamoxifen changes estrogen receptor mRNA expression and cell sensitivity.** *Cancer Lett* 2009, **275**(2):178-184.
340. Musgrove EA, Sutherland RL: **Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(9):631-643.
341. Su LF, Wang Z, Garabedian MJ: **Regulation of GRIP1 and CBP Coactivator activity by Rho GDI modulates estrogen receptor transcriptional enhancement.** *J Biol Chem* 2002, **277**(40):37037-37044.
342. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL: **Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells.** *Endocr Relat Cancer* 2003, **10**(2):179-186.
343. Lo AC, Georgopoulos A, Kleer CG, Banerjee M, Omar S, Khaled H, Eissa S, Hablas A, Omar HG, Douglas JA *et al*: **Analysis of RhoC expression and lymphovascular emboli in inflammatory vs non-inflammatory breast cancers in Egyptian patients.** *Breast* 2009, **18**(1):55-59.
344. Baron S, Escande A, Alberola G, Bystricky K, Balaguer P, Richard-Foy H: **Estrogen receptor alpha and the activating protein-1 complex cooperate during insulin-like growth factor-I-induced transcriptional activation of the pS2/TFF1 gene.** *J Biol Chem* 2007, **282**(16):11732-11741.
345. Balaguer P, Boussioux AM, Demirpençe E, Nicolas JC: **Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands.** *Luminescence* 2001, **16**(2):153-158.
346. Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Kim H, Kemper JK, Nardulli AM: **Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **88**(2):113-122.
347. Zhang H, Xie X, Zhu X, Zhu J, Hao C, Lu Q, Ding L, Liu Y, Zhou L, Huang C *et al*: **Stimulatory cross-talk between NFAT3 and estrogen receptor in breast cancer**

cells. *J Biol Chem* 2005, **280**(52):43188-43197.348. Noonan EJ, Place RF, Pookot D, Basak S, Whitson JM, Hirata H, Giardina C, Dahiya R: **miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer.** *Oncogene* 2009, **28**(14):1714-1724.

NOM : MEUNIER

Titre : Interrelations entre les protéines Rho et le récepteur des œstrogènes

Directrice de thèse : Pr. Sophie Doisneau-Sixou

Ville et date de soutenance : Toulouse, le 29 septembre 2010

Résumé

L'hormonothérapie est recommandée dans environ deux tiers des cancers du sein exprimant le récepteur des œstrogènes (RE) et/ ou le récepteur de la progestérone (RP). Cependant, il y a apparition systématique de résistances qui imposent la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques. Les œstrogènes agissent *via* le RE α mais il a été démontré des interrelations majeures entre le RE α et la voie de facteurs de croissance en particulier avec les protéines Rho. L'objectif de ce travail de thèse était de déterminer s'il existe un dialogue entre le RE α et les protéines Rho A, B et C, les éventuels mécanismes mis en jeu et l'implication dans la tumorigenèse mammaire.

Dans un premier temps, nos résultats ont permis de mettre en évidence que RhoB est un élément clé de la régulation de l'expression du RE α et du RP. Pour cela, nous avons utilisé des modèles cellulaires, animaux et des tumeurs de patientes. En effet, une régulation réciproque positive existe entre ces deux protéines et RhoB apparaît comme ayant un rôle de promoteur dans des cellules de cancers du sein hormonodépendantes, contrairement à son rôle connu de suppresseur de tumeur pour d'autres cancers. De plus, RhoB modifie clairement les activités transcriptionnelles liées au RE α et l'équilibre des cofacteurs, y compris du RE α lui-même, recrutés sur le promoteur de RP.

Dans un second volet de ce travail, nous nous sommes concentrés sur les effets de RhoA et RhoC sur les activités du RE α . RhoA et RhoC modifient également le recrutement de RE α sur les promoteurs de différents gènes cibles du RE α mais sans corrélation avec les modulations d'activités transcriptionnelles observées. A l'inverse de RhoB, RhoA diminue l'expression du RE α alors que RhoC n'a pas d'effet.

L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de montrer que malgré leur très forte homologie, RhoA, B et C ont toutes 3 des rôles, mais différents, sur l'expression et les effets transcriptionnels du RE α dans les cellules de cancers du sein. De plus, l'importance de RhoB comme agent pro-prolifératif dans des cellules mammaires hormonodépendantes est un axe majeur à développer.

MOTS CLES : Adénocarcinomes mammaires, protéines Rho A, B et C, récepteurs des œstrogènes, HDAC1.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Innovation Pharmacologique