

Identification de co-régulateurs impliqués dans la réponse transcriptionnelle induite par les récepteurs AhR et ER α

Par

Coumba Cissokho

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-91012-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-91012-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Le 3 août 2012

*le jury a accepté le mémoire de Madame Coumba Cissokho
dans sa version finale.*

Membres du jury

**Professeur Luc R. Gaudreau
Directeur de recherche
Département de biologie**

**Monsieur Benoît Leblanc
Membre
Département de biologie**

**Professeur Nicolas Gévry
Président rapporteur
Département de biologie**

SOMMAIRE

AhR est un facteur de transcription ayant un rôle dans la physiologie normale comme le développement du foie et du système immunitaire. Ce facteur est aussi responsable du métabolisme des « Aryls hydrocarbonés » et est impliqué dans la détoxification cellulaire. Il a été montré, notamment dans le laboratoire, que le récepteur aux œstrogènes α (ER α) régule différemment des gènes cibles de AhR à savoir les gènes *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, suite au traitement avec le TCDD. Le niveau d'induction du gène *CYP1A1* diminue alors que celui du gène *CYP1B1* reste constant. Cela diminuerait le ratio *CYP1A1/CYP1B1* et ferait augmenter le risque pour le cancer. En effet, *CYP1A1* métabolise l'œstrogène (E2) en 2-OHE2 qui est bénéfique alors que *CYP1B1* métabolise cette hormone en 4-OHE2 dont les effets sont mutagènes. Le TCDD est un ligand protumoral de AhR. Il paraissait aussi très intéressant d'étudier un ligand antitumoral de AhR, le DIM. Nous avons vu que DIM, tout comme le TCDD, induit les gènes cibles de AhR et le recrutement de ce dernier, mais à un niveau plus faible. Le traitement à l'E2, suite à l'induction au DIM, contrairement au TCDD, n'a pas d'effet sur l'expression des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Nous avons aussi montré que le DIM mime les effets de l'E2 en induisant le recrutement de ER α aux gènes cibles de AhR et ce recrutement n'augmente pas à l'ajout de l'E2. Un mécanisme de plus par lequel le DIM exerce son effet anticancérigène, à savoir le maintien du ratio *CYP1A1/CYP1B1* dans la cellule est proposé.

La régulation différentielle des gènes cibles de AhR par ses deux ligands, le DIM et le TCDD, et l'effet distinct de ER α à ces gènes suggèrent un recrutement de différents co-régulateurs à ces gènes. Afin d'identifier les co-régulateurs, nous avons utilisé une technique de fractionnement de complexes protéique sur gradient de sucrose suivi d'immunoprécipitations de la chromatine. Cela dans le but d'isoler les promoteurs fonctionnellement distincts et d'envoyer les protéines recueillies pour une analyse en spectrométrie de masse. Pour identifier des co-régulateurs nous avons d'abord vérifié l'efficacité du gradient de sucrose et avons

obtenu une sédimentation différentielle des complexes protéiques selon leurs tailles. Les immunoprécipitations sur les fractions ont montré certaines avec un profil d'enrichissement des protéines AhR et ER α semblable à celui dans les extraits protéiques totaux suite aux différents traitements. Des optimisations restent à faire pour avoir assez de matériel pour faire des immunoprécipitations sur les fractions et envoyer les immunoprécipitats pour une analyse en spectrométrie de masse afin d'identifier des co-régulateurs potentiels.

Les expériences réalisées dans le cadre de mon projet de maîtrise ont permis une meilleure compréhension de la régulation différentielle des gènes cibles de AhR par ER α suite au traitement soit par un ligand protumoral ou antitumoral, et le lien avec le cancer.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Luc Gaudreau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir ainsi permis de faire mon projet de maîtrise dans le laboratoire. Son amour pour la recherche, ses conseils et son expertise m'auront marqué. Je remercie ensuite mes conseillers le Dr Viktor Steimle, le Dr Nicolas Gévry et le Dr Benoît Leblanc pour leurs précieux conseils et suggestions par rapport aux expériences de laboratoires.

Je remercie tous les membres du laboratoire Gaudreau en particulier Liette Laflamme et Maud Marques pour m'avoir aidé dans les procédures de laboratoire et la compréhension de plusieurs aspects de la littérature sur le projet. Je remercie encore Liette pour avoir pris le temps de réviser mon mémoire. Je remercie Benoit Guillemette et Jean François Millau pour leurs précieux conseils par rapport à différentes techniques de laboratoires. Je remercie Manon Dufresne pour l'aide dans la culture cellulaire.

Un grand merci à mes parents, frères et sœurs pour leurs soutiens et encouragements tout au long de ce cheminement. Finalement, je remercie les organismes subventionnaires à savoir l'IRSC et la chaire de recherche du Canada sans lesquels mon projet n'aurait pas eu lieu.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	II
REMERCIEMENTS	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	VII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
INTRODUCTION	1
La transcription génique chez les eucaryotes.....	1
L'initiation de la transcription.....	4
Facteurs généraux de la transcription (GTF).....	4
Protéines activatrices de la transcription.....	6
Cofacteurs généraux de la transcription.....	7
Le médiateur.....	7
La chromatine.....	8
Le remodelage de la chromatine.....	9
Les modifications post traductionnelles des histones.....	11
L'acétylation.....	13
La méthylation.....	14
La phosphorylation.....	15
AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor).....	17
Mécanisme d'activation des gènes cibles de AhR.....	18
Co-régulateurs de AhR.....	19
Implication du TCDD dans le cancer du sein.....	22
Inhibition de la prolifération cellulaire par le TCDD.....	22
Génération de produits génotoxiques par le TCDD.....	23
Effet du DIM sur le cancer du sein.....	25
Inhibition de la prolifération cellulaire par le DIM.....	26
Génération de métabolites chimioprotecteurs par le DIM.....	27
ER α (Estrogen Receptor α).....	27
Mécanisme d'activation des gènes cibles de ER α	29
Co-régulateurs de ER α	30

Implication de l'estrogène dans le cancer du sein	32
Induction de la prolifération cellulaire par l'estrogène	33
Les interactions croisées entre AhR et ER α	34
Projet de maitrise	38
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	40
1.1 Culture cellulaire	40
1.2 CHIP (Immunoprécipitation de la chromatine).....	40
1.3 Sédimentation sur un gradient de sucrose	42
1.4 WB (Immunobuvardage de type Western)	42
1.5 Extraction d'ARN	43
1.6 qPCR (PCR quantitatif).....	43
CHAPITRE II: RÉSULTATS.....	45
2.1 Conditions optimales de traitement au DIM	45
2.2 Expression différentielle des gènes cibles de AhR selon le ligand	46
2.3 Recrutement différentiel de AhR selon le ligand.....	49
2.4 Effet oestrogène mimétique du DIM.....	50
2.5 Recrutement de ER α suite au traitement à l'E2 ou au DIM.....	53
2.6 Sédimentation différentielle des complexes protéiques sur un gradient de sucrose	54
2.7 Recrutement de AhR et de ER α sur toutes les fractions du gradient de sucrose	56
CHAPITRE III: DISCUSSION	58
CONCLUSION	62
BIBLIOGRAPHIE.....	65

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

‰: pour cent

8-oxo-dG: *8-oxo-deoxyguanosine*

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AF: fonction d'activation

AhR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

Arnt: *AhR nuclear translocator*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BRCA1: *Breast cancer 1*

BRE: *TFIIB-Recognition Element*

Brg-1: *Brahma/SWI2-related gene 1 protein*

CBP: *CREB binding protein*

CDK-2: *cyclin-dependent kinases 2*

CDKI: *CDK inhibitor*

ChIP: immunoprécipitation de la chromatine

CO₂: dioxyde de carbone

CTD: domaine C terminal

DBD: *DNA binding domain*

DCE: *Downstream Core Element*

DIM: 3,3'-diindolylméthane

DMBA: *7,12 dimethylbenz(a)-anthracene*

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DOC: déoxycholate

DPE: *Downstream Promoter Element*

E2: œstrogène
ECL: *enhanced chemiluminescence*
EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique
ER α : *Estrogen Receptor α*
FBS: *Fetal bovine serum*
FOXA1: *Forkhead box protein A1*
FPLC: *Fast protein liquid chromatography*
GCN5L2: *General control of amino acid synthesis protein 5-like 2*
GTF: facteurs généraux de la transcription
HAH: Hydrocarbones Aromatiques Halogénés
HAT: histone acétyle transférase
HDAC: histone déacétylase
Hepes: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HMT: histone méthyle transférase
HP1: *heterochromatin protein 1*
Inr: *Initiator element*
LBD: *ligand binding domain*
LCR: *locus control regions*
LiCl: chlorure de lithium
M: molaire
mg: milligramme
ml: millilitre
MTE: *Motif Ten Element*
NaCl: chlorure de sodium
NaHCO₃: bicarbonate de sodium
NCoA: *non-p160-related coactivator*
NCOR1: *nuclear receptor co-repressor 1*
NF-kB: facteur de transcription nucléaire- kB
NP40: *octylphenoxypolyethoxyethanol*
NURD: *Nucleosome remodeling and histone deacetylase*

°C: degrés Celsius
p/CAF: *P300/CBP-associated factor*
p/CIP: *p300/CBP cointegrator protein*
PAH: Hydrocarbones Aromatiques Polycycliques
PBS: *Phosphate buffered saline*
PCR: Réaction en chaîne par polymérisation
PenStrep: *Penicillin Streptomycin*
PIC: complexe de préinitiation de la transcription
PMSF: *phenylmethanesulfonylfluoride*
Pol: ARN polymérase
PRMT1: *Protein Arginine Methyltransferase 1*
qPCR: PCR quantitatif
Rb: *retinoblastoma protein*
RBCC: *RING finger-B boxes coiled coil*
RE: *response element*
ROS: espèces réactives oxygénées
rpm: rotation par minute
RT : *Reverse Transcription*
SDS : dodécylsulfate de sodium
SRC: *steroid receptor coactivator*
TAD: domaine de transactivation
TAF: *TBP-associated factors*
TBP: *TATA-binding protein*
TBS: *Tris Buffered Saline*
TCDD: *2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*
TF: facteur de la transcription
TFII: facteur de la transcription pour la Pol II
TGFa: *transforming growth factor α*
TIFa: *transcription intermediary factor 1-alpha*
T°: température

TR: *thyroid hormone receptor*

TRIP230: *TR/ Rb interacting protein 230*

Tris: *trishydroxyméthylaminométhane*

TSE: *Triton SDS EDTA Buffer*

TSS: *transcription start site*

USA: *upstream stimulatory activity*

WB: *Immunobuvardage de type Western*

XRE: *Xenobiotic Responsive Element*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les composants de la machinerie générale de la transcription des humains	5
Tableau 2: Les modifications de la chromatine	13
Tableau 3: Liste des amorces utilisées pour les analyses de RT-qPCR et de CHIP-qPCR	44

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique des éléments régulateurs typiques d'un gène	2
Figure 2: Les éléments du promoteur basal	3
Figure 3: Différentes familles de remodeleurs définies par leur domaine ATPase	11
Figure 4: La machinerie transcriptionnelle	16
Figure 5: Les domaines fonctionnels de AhR.....	19
Figure 6: Un modèle de la voie de signalisation de AhR	21
Figure 7: Structure du I3C et des deux produits de la réaction acide; Le DIM et le Ctr	26
Figure 8: Les domaines fonctionnels de ER α	28
Figure 9: Voie de signalisation génomique de ER α	30
Figure 10: Les mécanismes proposés d'inhibition des gènes cibles de ER α par AhR	36
Figure 11: Interactions croisées entre AhR et ER α par association directe	37
Figure 12: Temps optimal de traitement des cellules pour les essais de ChIP	46
Figure 13: Induction des gènes cibles de AhR après le traitement au ligand TCDD ou au DIM et le co-traitement avec l'E2.....	48
Figure 14: Recrutement de AhR après le traitement au ligand TCDD ou DIM et le co-traitement avec l'E2	50
Figure 15: Expression des gènes cibles de AhR après le traitement au DIM et l'ajout du ICI 182780..	52
Figure 16: Recrutement de ER α après le traitement au ligand TCDD ou au DIM et le co-traitement avec l'E2.....	54
Figure 17: Analyse par immunobuvardage de type Western sur les fractions en utilisant les anticorps contre l'actine et AhR suite au passage des extraits chromatiniens sur un gradient de sucrose.....	55
Figure 18: Recrutement de AhR et de ER α suite au traitement au TCDD et TCDD+E2 dans différentes fractions	57
Figure 19: Recrutement de AhR et ER α et induction différentielle des gènes cibles de AhR.....	64

INTRODUCTION

La transcription génique chez les eucaryotes

Au début des années 1950, la structure de l'ADN a été élucidée (Watson and Crick, 1953). On sait maintenant que les informations héréditaires des cellules sont codées dans la séquence nucléotidique de l'ADN. Une partie de l'information codée par le génome est constituée de gènes. Les gènes codant pour les protéines contiennent généralement deux familles de régulateurs transcriptionnels agissant en cis : a) un promoteur qui est composé du promoteur basal (*core promoter*) et du promoteur proximal b) des éléments régulateurs distaux constitués d'amplificateurs, d'atténuateurs, d'insolateurs et de LCR (*locus control regions*) (Maston et al., 2006) (Figure 1).

Le promoteur basal est la région du début du gène qui sert de site d'initiation pour l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle, définit la position du TSS (*transcription start site*) et la direction de la transcription. Le promoteur basal peut être composé de la boîte TATA, du Inr (*Initiator element*), du DPE (*Downstream Promoter Element*), du DCE (*Downstream Core Element*), du BRE (*TFIIB-Recognition Element*) et du MTE (*Motif Ten Element*) (Figure 2). Le promoteur proximal est défini comme étant la région immédiatement en amont du promoteur basal. Il peut contenir typiquement plusieurs sites de liaison à des activateurs (Maston et al., 2006). Contrairement au promoteur proximal, l'amplificateur stimule la transcription à de longues distances. Les amplificateurs sont fonctionnellement similaires au promoteur proximal. En général les mêmes activateurs qui se lient aux amplificateurs se lient au promoteur proximal dans différents gènes. Il peut se situer à des milliers de paires de bases en amont ou en aval du promoteur, dans un intron ou après l'extrémité 3' du gène (Blackwood and Kadonaga, 1998). Des études ont montré que l'amplificateur et le promoteur proximal sont rapprochés lors de l'initiation de la transcription

par un mécanisme de formation de boucle (Vilar and Saiz, 2005). Les atténuateurs sont des séquences spécifiques qui confèrent un effet négatif sur la transcription des gènes cibles. Les atténuateurs sont des sites de liaison aux répresseurs. Comme les amplificateurs, ils fonctionnent indépendamment de l'orientation et de la distance du promoteur (Maston et al., 2006).

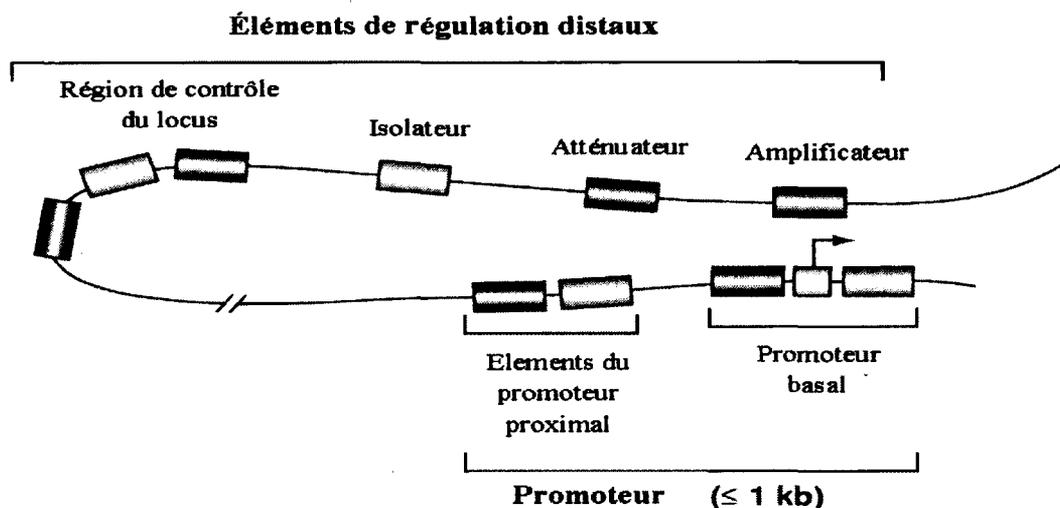


Figure 1: Représentation schématique des éléments régulateurs typiques d'un gène (Adapté de (Maston et al., 2006)). Le promoteur est composé du promoteur basal et du promoteur proximal qui font une distance d'environ 1kb. Les éléments régulateurs distaux incluent les amplificateurs, les atténuateurs, les isolateurs et les LCR.

L'initiation de la transcription

Le passage de l'ADN à l'ARN se fait par une enzyme appelée ARN polymérase (Pol) (Weiss and Gladstone, 1959). Les eucaryotes ont trois Pols; Pol I, II et III (Roeder and Rutter, 1969). Ces trois Pol ont une structure semblable, mais des fonctions différentes. La Pol I et III transcrivent les gènes codant pour les ARN de transfert, les ARN ribosomiaux et de nombreux petits ARN. La Pol II, qui portera notre intérêt dans cette étude, transcrit la grande majorité des gènes, incluant ceux codant pour les protéines. Des signaux codés par l'ADN indiquent à la polymérase le début et la fin de la transcription. L'initiation de la transcription est une étape très importante. C'est à ce niveau que la cellule détermine quelle protéine produire, à quel niveau et à quelle vitesse.

Facteurs généraux de la transcription (GTF)

La Pol II a besoin de nombreuses protéines supplémentaires pour médier la transcription basale. Cette dernière est constitutive, généralement à un faible niveau et est indépendante des facteurs de régulation comme les activateurs. Ces protéines supplémentaires sont appelées les GTF. Les GTF sont constitués de la Pol II et d'un ensemble de protéines appelé facteurs de la transcription pour la Pol II (TFII) (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH), assemblés au promoteur basal de manière ordonnée pour former le complexe de pré-initiation de la transcription (PIC) (Thomas and Chiang, 2006). Les TFII aident au bon positionnement de la Pol II sur le promoteur, à la séparation des deux brins d'ADN hélicoïdaux pour permettre à la transcription de commencer, et à l'élongation de la transcription en libérant la Pol II du promoteur. Ces protéines sont nécessaires à presque tous les promoteurs utilisés par la Pol II. La Pol II peut s'assembler en holoenzyme contenant certains GTF et enzymes de modification de la chromatine avant de se lier au promoteur (Wu and Chiang, 1998; Wu et al., 1999). La Pol II contient 12 sous-unités nommées RPB1 à RPB12 en ordre décroissant de leur poids moléculaire (Young, 1991). Il existe trois formes de Pol II, en fonction de la présence et du niveau de phosphorylation du domaine C terminale (CTD) (Kershnar et al., 1998). La forme

IIA est hypophosphorylée ou non phosphorylée, c'est elle qui est impliquée dans le complexe de préinitiation de la transcription (PIC) (Lu et al., 1991; Serizawa et al., 1993). La forme IIO est hyperphosphorylée, elle est impliquée dans l'élongation et la terminaison de la transcription. Cette phosphorylation se fait majoritairement sur les serines 2 et 5. La forme IIB ne contenant pas de CTD est dérivée de la protéolyse. La fonction précise des différents composants des GTF est résumée dans le tableau 1.

Tableau 1: Les composants de la machinerie générale de la transcription des humains (Adapté de (Thomas and Chiang, 2006)).

Facteur	Composition protéique	Fonction
TFIIA	P35 (α), p19 (β), et p21 (γ)	Anti-répresseur; stabilise le complexe TBP-TATA; co-activateur
TFIIB	P33	Sélection du site d'initiation; stabilise le complexe TBP-TATA; recrute Pol II/TFIIF
TFIID	TBP + TAFs (TAF1-TAF14)	Facteur de liaison au promoteur basal; co-activateur; Protéine kinase; Ubiquitine-activation/activité de conjugaison; Histone acétyle transférase
TFIIE	P56 (α) et p34 (β)	Recrute TFIIH; Facilite la formation d'un compétent d'initiation Pol II; Impliqué dans le dégagement du promoteur
TFIIF	RAP30 et RAP74	Lie la Pol II et facilite de recrutement de la Pol II au promoteur; recrute TFIIE et TFIIH; Fonctionne avec TFIIB et Pol II dans la sélection du site d'initiation; Facilite le dégagement de la Pol II du promoteur; Augmente l'efficacité de l'élongation par la Pol II
TFIIH	P89/XPB, p80/XPB, p62, p52, p44, p40/CDK7, p38/Cyclin H, p34, p32/MAT1, et p8/TFB5	Activité ATPase pour l'initiation de la transcription et le dégagement du promoteur; Activité hélicase pour l'ouverture du promoteur; Activité kinase pour la phosphorylation de la Pol II au CTD; Activité E3 ubiquitine ligase
Pol II	RPB1-RPB12	Initiation de la transcription, élongation, et terminaison; Recrutement des enzymes pour la coiffe des ARNm; Transcription associée au recrutement des facteurs d'épissage et de la maturation de l'extrémité 3'; Phosphorylation du CTD, glycosylation et ubiquitination

Protéines activatrices de la transcription

Des expériences ont montré que la Pol II et les GTF sont suffisants pour induire la transcription basale, mais des niveaux supérieurs (activés) de la transcription requièrent l'implication des activateurs (Patikoglou and Burley, 1997). Les activateurs sont des protéines régulatrices dont la fonction est d'activer la transcription de l'ADN en se liant à des séquences spécifiques sur ce dernier appelées RE (site de liaison à l'ADN) (Georges et al., 2010). Les RE peuvent être localisés au promoteur proximal (proche du TSS), à l'amplificateur ou d'autres séquences d'ADN régulatrices qui se situent à plusieurs paires de bases loin du promoteur. Les activateurs ont une affinité de 10^6 fois supérieure pour leurs RE comparativement au reste de la séquence d'ADN (Reményi et al., 2004). Les RE sont généralement petits, entre 6 et 12 pb. Plusieurs classes d'activateurs qui se distinguent par leur domaine de liaison à l'ADN ont été identifiées (Pabo and Sauer, 1992). Il y a 80% des activateurs qui contiennent un domaine hélice-tour-hélice, hélice-loop-hélice, doigt de zinc ou glissière de leucine (Lewin, 2000). Ces différents motifs structuraux résultent en une spécificité de l'activateur pour les séquences consensus auxquelles il se lie (Reményi et al., 2004). Le récepteur Aryl hydrocarbure et le récepteur d'œstrogène sont des exemples de récepteurs faisant partie respectivement de la famille hélice-loop-hélice et doigt de zinc (Johnson, 1991; Mangelsdorf et al., 1995). Nous reviendrons plus en détail sur les propriétés de ces deux récepteurs. Pour l'activation de la transcription, plusieurs activateurs peuvent former des hétérodimères et/ou homodimères. Dans ce cas, leur site de liaison se compose de deux moitiés de site (Claessens and Gewirth, 2004).

Outre leurs domaines de liaison à l'ADN, les activateurs possèdent un domaine d'activation requis pour l'activation de la transcription génique (Ptashne and Gann, 1997). Le domaine d'activation est un module d'interaction protéine-protéine qui recrute directement les co-régulateurs. Certains facilitent le remodelage de la chromatine alors que d'autres assistent les activateurs dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Näär et al., 2002). Les activateurs peuvent interagir directement avec la Pol II, mais généralement ils la recrutent

indirectement par l'intermédiaire d'autres facteurs essentiels pour sa liaison. Les activateurs peuvent affronter la structure de la chromatine de différentes manières. En général, le site de liaison des activateurs se trouve dans le fragment d'ADN qui n'est pas associé aux histones. Ce dernier mécanisme pourrait être celui qui est couramment utilisé *in vivo* pour permettre l'accès des activateurs à leurs sites (Morse, 2003). Dans de rares cas, le site de liaison de l'activateur peut se trouver à la surface du nucléosome. La liaison pourrait résulter soit au déplacement, soit à la perturbation du nucléosome. L'activateur pourrait se lier au nucléosome sans entraîner la perturbation de ce dernier, résultant en la formation d'un complexe avec le nucléosome. Un seul activateur peut être utilisé pour activer plusieurs gènes dans le génome, procurant ainsi un mécanisme pour un contrôle coordonné des gènes. Aussi, des gènes individuels peuvent être régulés par l'action de plusieurs activateurs, procurant un mécanisme pour un contrôle combiné (Ptashne and Gann, 2002). De la même manière, la transcription peut être inhibée par des répresseurs, qui, lorsqu'ils se lient à des séquences d'ADN répressives, empêchent la machinerie transcriptionnelle de transcrire le gène. Il est maintenant bien établi que les activateurs et les répresseurs sont des composants importants du circuit régulateur qui assure la transcription précise du gène en rapport aux besoins particuliers de la cellule.

Cofacteurs généraux de la transcription

Pour la transcription dépendante des activateurs, les cofacteurs généraux sont souvent requis pour transmettre les signaux régulateurs entre les activateurs et la machinerie de transcription générale. Il y a trois classes de cofacteurs, les TAF, le médiateur et les USA (*upstream stimulatory activity*).

Le médiateur

Le médiateur est composé de 20 sous unités. Seule la sous-unité Srb4/Med17 est essentielle pour la transcription des gènes. Le médiateur est constitué de 3 domaines visibles (tête, milieu,

queue) qui peuvent adopter des conformations différentes en fonction de leur partenaire d'interaction (activateurs ou CTD de la Pol II) (Blazek et al., 2005; Chadick and Asturias, 2005; Conaway et al., 2005). C'est un complexe protéique qui permet aux protéines activatrices de communiquer correctement avec la Pol II. Il s'associe au CTD de la Pol II sur une surface en présentant les autres surfaces pour l'interaction avec les activateurs liés à l'ADN. Malgré son rôle central dans la transcription, la déplétion des unités individuelles du médiateur n'affecte l'expression que d'une petite quantité de gènes. Différentes déplétions affectent des gènes distincts du fait que les activateurs se lient à des sous-unités différentes du médiateur pour amener la polymérase à ces gènes. La tête du médiateur subit un changement conformationnel drastique quand elle est associée à la Pol II. Des contacts additionnels se font entre le milieu du médiateur et la Pol II (Davis et al., 2002). Ces contacts avec la Pol II permettent le relâchement de la structure compacte du médiateur. La sous-unité milieu du médiateur peut interagir avec plusieurs récepteurs nucléaires (Yuan et al., 1998). Le médiateur a un rôle inhibiteur de la transcription par la phosphorylation du CTD grâce à sa sous-unité CDK8 avant l'assemblage du PIC (Hengartner et al., 1998).

La chromatine

L'ADN chromosomique qui a une longueur linéaire, chez l'humain, de 2 m doit être empaqueté dans un noyau d'environ 15 μM de diamètre. Pour se faire, une structure chromatinienne, une collaboration entre l'ADN et les protéines d'empaquetage (histones), est mise en place (Khorasanizadeh, 2004). Les histones replient l'ADN ce qui résulte en une chromatine compactée avec un plus petit volume. Il existe 5 niveaux de compaction de la chromatine allant d'une structure en collier de perles de 11 nm de diamètre à une structure du chromosome mitotique de 1 400 nm de diamètre (Felsenfeld and Groudine, 2003). La compaction représente une barrière pour l'accessibilité des facteurs de transcription à l'ADN (Workman and Kingston, 1998). L'initiation de la transcription doit donc faire face à cette structure compacte de la chromatine. En effet, 146 paires de bases d'ADN sont enroulées autour du noyau octamérique d'histones formant un nucléosome. Le noyau octamérique est

formé d'un tétramère d'histones H3 et H4 et de deux dimères d'histones H2A et H2B (Camerini Otero et al., 1976; Kornberg and Thomas, 1974; Sollner Webb et al., 1976). Les nucléosomes voisins sont associés via l'histone H1 qui facilite les compactations additionnelles.

Le promoteur pourrait donc être incorporé dans le nucléosome rendant la boîte TATA inaccessible supprimant ainsi la transcription basale (Imbalzano et al., 1994). Certains facteurs sont requis pour surmonter la répression de la transcription des gènes dont les promoteurs sont enroulés sous forme de nucléosome. Les enzymes de modification de la chromatine jouent un rôle important pour la reconnaissance de la boîte TATA par le TFIID en altérant la structure de la chromatine autour de la boîte TATA (Martinez-Campa et al., 2004). Les enzymes de modification de la chromatine doivent reconfigurer la structure du nucléosome de manière à réduire les interactions protéines-ADN ou en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer le contact histone-ADN (Fischle et al., 2003; Horn and Peterson, 2002). On discutera plus en détail de ces deux manières de reconfigurer la structure du nucléosome. Une enzyme de modification peut être utilisée à plusieurs promoteurs. Aussi, un même promoteur peut utiliser différentes enzymes de modification à différentes circonstances. Il est à noter qu'il y a des enzymes qui peuvent directement méthyliser l'ADN aux sites CpG, affectant négativement la transcription des gènes (tableau 2). Les différents composants de la machinerie transcriptionnelle sont montrés à la figure 4.

Le remodelage de la chromatine

L'empaquetage de l'ADN chromosomique par les nucléosomes condense et organise le génome. Les changements dans les nucléosomes peuvent aider la machinerie de transcription à accéder au promoteur. Le remodelage de la chromatine peut libérer les sites de liaison sur l'ADN qui, dans d'autres cas, seraient masqués (Clapier and Cairns, 2009). Les enzymes de remodelage de la chromatine utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer le contact histone-ADN (Narlikar et al., 2002). En utilisant l'énergie libérée au cours de l'hydrolyse, l'ADN est déplacé par rapport au cœur du nucléosome. Cela modifie temporairement la

structure du nucléosome rendant ainsi l'ADN un peu moins fortement lié au cœur protéique. Par des cycles successifs d'hydrolyse de l'ATP, certains complexes de remodelage peuvent catalyser le glissement des nucléosomes. En déplaçant le cœur du nucléosome sur l'ADN, ces remodeleurs rendent l'ADN du nucléosome accessible aux autres protéines de la cellule. La sous-unité qui hydrolyse l'ATP se lie à la fois au cœur protéique du nucléosome et à la double hélice d'ADN autour des histones. Les remodeleurs peuvent aussi reconnaître les modifications covalentes sur les histones (Clapier and Cairns, 2009). Il y a actuellement quatre différentes familles de complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNF, ISWI, CHD, INO80) (figure 3). Toutes les quatre familles utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les contacts histone-ADN. Cependant elles sont aussi spécialisées pour des rôles particuliers et des contextes biologiques différents médiés par leurs domaines uniques résidant dans leurs sous-unités catalytiques ATPase ainsi que par leurs uniques protéines associées (Clapier and Cairns, 2009). Tous les remodeleurs partagent cinq propriétés basales : 1) ils ont une affinité pour le nucléosome, au-delà de l'ADN 2) ils possèdent un domaine qui reconnaît les modifications covalentes sur les histones 3) ils ont un domaine ATPase dépendant de l'ADN requis pour le remodelage et servant de moteur de translocation pour briser les contacts ADN-histone 4) ils possèdent des domaines et/ou protéines qui régulent le domaine ATPase 5) ils possèdent des domaines et/ou protéines pour l'interaction avec les histones ou des facteurs de transcription (Clapier and Cairns, 2009). SWI/SNF est un exemple d'enzyme de remodelage de la chromatine ATP dépendant qui augmente l'accès du TBP à la boîte TATA (Imbalzano et al., 1994). Des études ont montré que SWI/SNF peut être recruté par des activateurs à des gènes spécifiques (Peterson et al, 2000). Le complexe SWI/SNF pourrait être important pour la stimulation ligand-dépendante de la transcription par les récepteurs stéroïdiens, le complexe peut se lier aux récepteurs nucléaires (Muchardt and Yaniv, 1993; Wallberg et al., 2000). SWI/SNF possède un bromodomaine qui reconnaît les lysines acétylées sur les histones (figure 3).

Le rôle des enzymes de remodelage de la chromatine n'est pas uniquement d'aider les activateurs de la transcription. Elles sont aussi impliquées dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle par les répresseurs, dans la réplication et la réparation de l'ADN (Citterio et

al., 2000; Guschin and Wolffe, 1999; Moreira and Holmberg, 1999; Murphy et al., 1999; Tyler and Kadonaga, 1999).

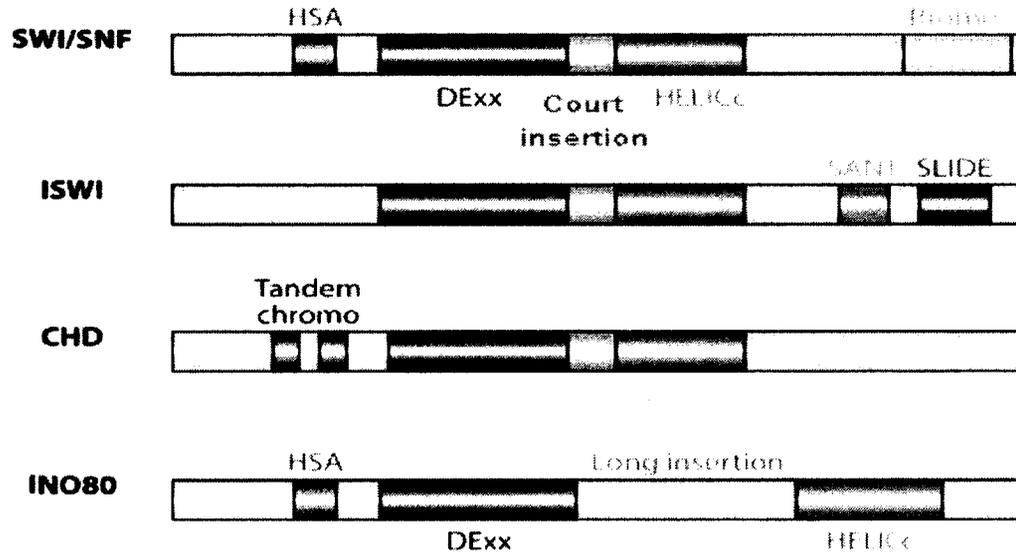


Figure 3: Différentes familles de remodeleurs définies par leur domaine ATPase (Adapté de (Clapier and Cairns, 2009)). Tous les remodeleurs contiennent une sous-unité SWI2/SNF2 capable d'hydrolyser l'ATP caractérisée par un domaine ATPase qui est divisé en deux parties DExx (*rouge*) et HELICc (*orange*). Le domaine unique résidant dans le domaine ATPase distingue chacune des familles. Les familles des remodeleurs SWI/SNF, ISWI, et CHD possèdent chacune une courte insertion (*gris*) dans la sous-unité ATPase alors que la famille INO80 possède une longue insertion (*jaune*).

Les modifications post traductionnelles des histones

Les procédés tels que la transcription nécessitent l'accès à l'ADN. Depuis les études pionnières de Vincent Allfrey, nous savons que les histones subissent des modifications post-traductionnelles (Allfrey et al., 1974). Les modifications post-traductionnelles des histones régulent la structure de la chromatine et sont donc impliquées dans la régulation de la transcription (Edmunds et al., 2008; Snykers et al., 2009).

Les chaînes latérales des acides aminés des quatre histones du cœur du nucléosome sont soumises à une variété de modifications covalentes (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, ADP-ribosylation et sumoylation) (van Holde, 1989). Les différents sites de modification sur les histones ainsi que leurs rôles transcriptionnels sont indiqués dans le tableau 2. Je m'intéresserai davantage aux modifications les mieux caractérisées telles que l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation. Les queues qui sortent de la surface de la chromatine sont sensibles aux protéases et représentent 25 à 30% de la masse des histones individuelles (van Holde, 1989; Wolffe and Hayes, 1999). Elles procurent donc une surface exposée pour des interactions potentielles avec d'autres protéines. Tous les types de modifications sont réversibles. Les modifications sont effectuées par des enzymes spécifiques. Pour la plupart, le recrutement de ces enzymes dépend de protéines régulatrices de gènes qui se fixent à des séquences d'ADN spécifiques. Les modifications peuvent altérer la structure de la chromatine en influençant les contacts histone-ADN, histone-histone, histone-autres protéines et l'arrimage de protéines (Hansen et al., 1998; Hansen et al., 1998; Wolffe and Hayes, 1999). Les modifications sur les queues N terminales des histones résultent en une identité hétérogène de chaque nucléosome que la cellule interprète comme un code épigénétique (Ito, 2007).

Tableau 2: Les modifications de la chromatine (Adapté de (Berger, 2007)).

Marque	Sites pertinents	Rôle transcriptionnel
Méthylation de l'ADN		
Cytosine méthylée (meC)	Ilots CpG	Répression
PTMs d'histone		
Lysine acétylée (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16) H2A, H2B	Activation
Sérine phosphorylée/ thréonine (S/Tph)	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Arginine méthylée (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Lysine méthylée (Kme)	H3 (4, 36, 79) H3 (9, 27), H4(20)	Activation Répression
Lysine ubiquitinylée (Kub)	H2B (120) H2A(119)	Activation Répression
Lysine sumoylée (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Répression

L'acétylation

L'acétylation est une des modifications les mieux caractérisées. Les histones acétyl transférases (HAT) catalysent l'addition de groupe acétyl sur les histones. De la même manière, les histones déacétylases (HDAC) catalysent l'enlèvement du groupe acétyl. Les HAT sont des coactivateurs transcriptionnels. Plusieurs HAT, comme CBP (*CREB-binding protein*) et p300 (*related E1A-interacting protein*), sont des composantes d'un large complexe contenant plusieurs sous-unités recrutées aux promoteurs en interagissant avec les activateurs liés à l'ADN (Côté et al., 1995; Utley et al., 1998). Les HAT utilisent l'acétyl CoA comme cofacteur pour catalyser le transfert d'un groupement acétyl au groupe ε-amine des chaînes

lysine. Les HAT ciblent particulièrement les résidus lysine hautement conservés de l'histone H3 sur la queue N terminale (9, 14, 18, 23) et de l'histone H4 (5, 8, 12, 16) (Roth et al., 2001) (tableau 2). Cela permet la neutralisation des charges basiques des queues d'histones. Cette action réduirait l'affinité des histones pour l'ADN et altérerait les interactions histone-histone entre les nucléosomes adjacents de même que les interactions entre les histones et les autres protéines régulatrices (Grant and Berger, 1999; Roth et al., 2001). Les histones acétylées sont associées à une chromatine transcriptionnellement active contrairement aux histones déacétylées. De plus, il y a une corrélation positive entre le niveau d'acétylation du gène et son activité transcriptionnelle (Roth et al., 2001). L'acétylation des histones peut donc stimuler l'activité transcriptionnelle directement en relâchant les interactions ADN-nucléosome qui constituent une barrière pour le recrutement des facteurs de la transcription (Legube and Trouche, 2003). En plus de l'influence électrostatique de l'acétylation, les histones ayant cette modification sont reconnues par plusieurs protéines contenant un bromodomaine (Bottomley, 2004; Taverna et al., 2007). Il est à noter que les HAT peuvent agir sur d'autres substrats que les histones. Par exemple, des études ont montré que p300 acétyle p53 entraînant l'augmentation de la liaison de ce facteur à l'ADN de manière séquence spécifique (Gu and Roeder, 1997).

La méthylation

La méthylation des histones peut se faire sur les résidus arginines ou lysines. La méthylation sur les résidus arginines est impliquée dans l'activation des gènes (tableau 2). La méthylation des histones se fait par les histones méthyle transférases (HMT). Ces enzymes sont recrutées aux promoteurs en tant que des co-activateurs de la transcription. Les histones H3 (lysines 4, 9, 27) et H4 (lysine 20) sont préférentiellement méthylés (Strahl et al., 1999). Les histones contenant cette modification sont reconnues par des protéines contenant des chromodomaines (Brehm et al., 2004; Tajul-Arifin et al., 2003).

Les lysines modifiées ont la capacité d'être mono-, di-, ou tri- méthylés ajoutant de la complexité au statut post-traductionnel. L'enzyme hétérochromatique Suvar3-9 a une activité méthyltransférase sur la lysine 9 de l'histone H3. L'histone H3 méthylée sur la lysine 9 procure un site de liaison pour le chromodomaine contenu dans la protéine répressive HP1 (heterochromatin protein 1) ce qui induit la répression de la transcription et la formation de l'hétérochromatine (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nakayama et al., 2001). L'hétérochromatine est enrichie en la triméthylation de l'histone H3 (lysine 9, 27) et de l'histone H4 (lysine 20) alors que l'euchromatine, chromatine à configuration ouverte, est enrichie en la triméthylation de l'histone H3 (lysine 4, 36, 79).

La phosphorylation

Les queues d'histones peuvent être modifiées par la phosphorylation. Cette modification est moins bien étudiée que les deux premières déjà discutées. La phosphorylation des histones H1 et H3 est impliquée dans la condensation des chromosomes pendant la mitose (Bradbury, 1992). La phosphorylation de l'histone H3 a été associée à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle (Cheung et al., 2000). Les cellules déficientes en Rsk-2, qui est une kinase de l'histone H3, montrent une altération du profil d'activation transcriptionnel (De Cesare et al., 1998). Rsk-2 a été montré comme phosphorylant la serine 10 de l'histone H3. Des études ont montré que la phosphorylation de l'histone H3S10 induit la transcription des gènes immédiats comme c-fos et c-jun (Mahadevan et al., 1991). La phosphorylation de l'histone H2A est responsable de la condensation des chromosomes (Grant, 2001). La phosphorylation sur les histones peut être reconnue par les membres de la famille de protéines 14-3-3 (Maldonado, 1999).

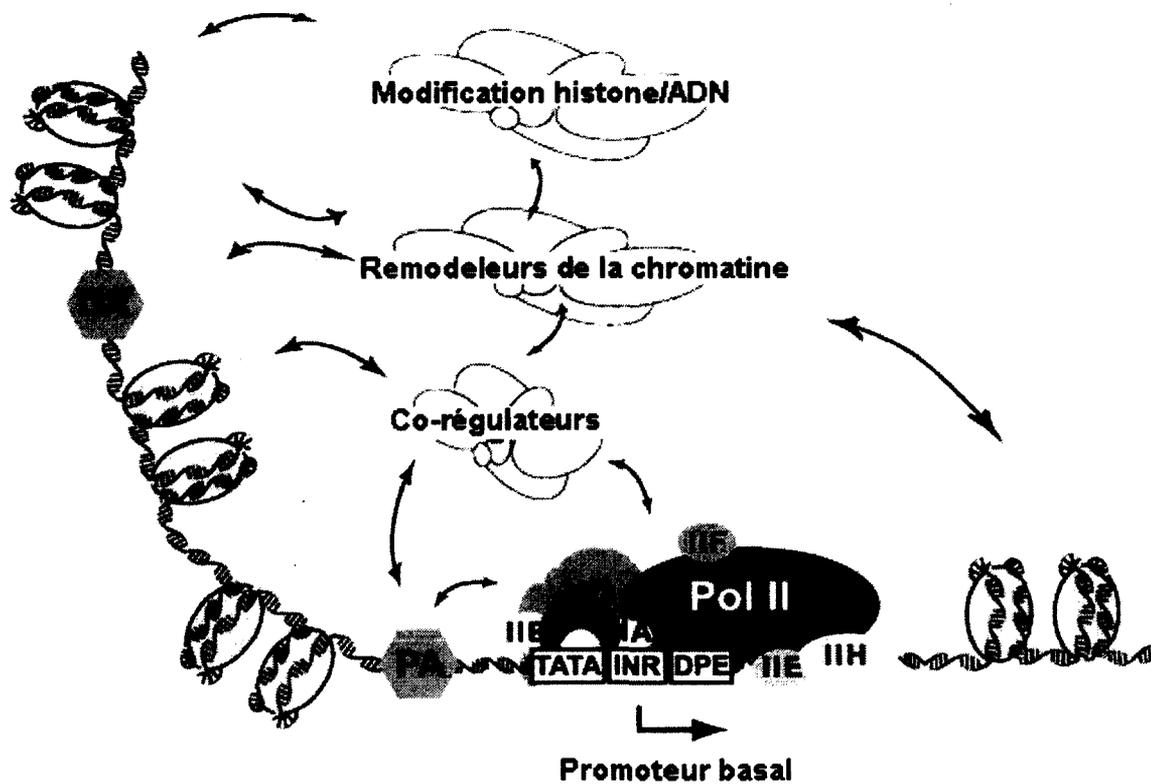


Figure 4: La machinerie transcriptionnelle (Adapté de (Hochheimer and Tjian, 2003)). Enzymes de modification des queues d'histones; enzymes de remodelage de la chromatine ATP dépendant; Activateurs de la transcription localisés au PA (promoteur proximal) ou au DA (promoteur distal); Les facteurs de transcription de base (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, and TFIIH) et l'ARN polymérase II avec les éléments du promoteur basal comme la boîte TATA (TATA), l'initiateur (Inr), et le DPE (element en aval du promoteur).

AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor)

AhR est un facteur de transcription activé par un ligand qui contrôle l'expression de divers gènes (Hankinson, 1995). Ce récepteur est hautement conservé entre les vertébrés et les invertébrés (Hahn, 2002). Il joue un rôle dans la physiologie normale comme le développement du foie et du système immunitaire (Fernandez-Salguero et al., 1995). Il joue aussi un rôle dans le développement vasculaire, dans la reproduction et dans les fonctions nerveuses (McMillan and Bradfield, 2007). Le rôle de AhR dans le métabolisme des Aryls hydrocarbonés est une adaptation des vertébrés (Powell-Coffman et al., 1998). AhR est aussi impliqué dans la détoxification cellulaire. Il est activé via sa liaison avec une grande variété de composés chimiques dont les plus caractérisés sont les Hydrocarbonés Aromatiques Polycycliques (PAH) et les Hydrocarbonés Aromatiques Halogénés (HAH). Le ligand le plus connu est le TCDD (Poland and Knutson, 1982; Safe, 1990). Ce dernier est très toxique et cancérigène. Les PAH et les HAH sont des contaminants environnementaux ubiquitaires et hydrophobes. AhR possède aussi des ligands naturels. Plusieurs études ont reporté des produits chimiques provenant de plantes qui peuvent activer AhR incluant le DIM (Jellinck et al., 1993). Ce dernier a été montré comme ayant un effet antitumoral (Terry et al., 2001). Aussi, AhR possède un ligand endogène, la kynurénine, qui a un effet procancérigène (Opitz et al., 2011b). Ce ligand est un produit du catabolisme du tryptophane. Les enzymes responsables de la formation de la kinurénine, l'IDO (*indoleamine-2,3-dioxygenase*) et la TDO (*tryptophan-2,3-dioxygenase*), sont activées par les cytokines pro-inflammatoires et les hormones de stress. Cette activation amène à une déplétion du tryptophane et à la génération de la kinurénine qui joue un rôle clef dans la modulation de la réponse immunitaire. La TDO, principalement exprimée dans le foie et les neurones, régule les concentrations de tryptophane après sa consommation par l'alimentation. La voie de la kinurénine qui est dérivée de l'IDO a été montrée comme étant impliquée dans plusieurs maladies incluant les maladies auto-immunes et le cancer où un déséquilibre dans le tryptophane et la kinurénine a été retrouvé (Okamoto et al., 2005; Opitz et al., 2007; Opitz et al., 2011a; Uyttenhove et al., 2003). Plus récemment il a été montré que la kinurénine, produite par les cellules tumorales, active AhR

en absence de substances chimiques environnementales toxiques. Ce ligand endogène est constitutivement généré par les tumeurs humaines via la TDO. La kinurénine est produite durant la progression du cancer et l'inflammation dans le microenvironnement local à des niveaux suffisants pour l'activation de AhR. Elle supprime la réponse immunitaire antitumorale et promeut la survie et la motilité des cellules tumorales par AhR de manière autocrine et paracrine (Opitz et al., 2011b).

Mécanisme d'activation des gènes cibles de AhR

AhR est responsable de l'activation des gènes de la famille des cytochromes p450 incluant *CYP1A1*, *CYP1A2* et *CYP1B1* (Kumar et al., 1987). Ces derniers font partie de la superfamille de l'hème contenant la monooxygénase (Nelson et al., 1996). *CYP1A1* et *CYP1A2*, chez humain, sont retrouvés au chromosome 15q23 et sont arrangés en une orientation tête à tête à une distance d'approximativement 23 kb l'un de l'autre (Corchero et al., 2001). *CYP1B1*, quant à lui, est localisé sur un chromosome différent de *CYP1A1* et *CYP1A2*. Il est situé au 2p21 (Tang et al., 1996). AhR fait partie de la famille des récepteurs Hélice-Loop-Hélice PAS (Per-Arnt-Sim). La liaison du ligand à AhR se fait par le domaine PAS B. La dimérisation de AhR avec Arnt (AhR nuclear translocator) se fait par l'interaction entre leurs domaines HLH et PAS. La liaison à l'ADN se fait principalement par leurs domaines basiques, bHLH (figure 5). Les régions C terminales de AhR et Arnt contiennent toutes les deux un domaine de transactivation (TAD) qui est généralement responsable de l'interaction avec d'autres protéines (Kumar and Perdew, 1999). Le domaine PAS B, en plus d'être responsable de la liaison du ligand, est responsable de l'interaction avec la protéine chaperonne hsp90. En condition normale, AhR est maintenu inactif dans le cytoplasme par la liaison avec HSP90-XAP2 (Kazlauskas et al., 2001). Le mécanisme d'activation des gènes cibles de AhR est illustré à la figure 6. Suite à la liaison au ligand, AhR est activé par un changement de conformation qui expose le signal de localisation nucléaire (NLS). AhR activé par le ligand translocalise au noyau et se dimérise avec Arnt qui est déjà présent dans ce compartiment cellulaire (Hankinson, 1995; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003). Le dimère va se lier aux

XRE (*Xenobiotic Responsive Elements*) présents dans le promoteur de ses gènes cibles ((Nebert and Gonzalez, 1987). De plus, des études de *footprint* ont montré que la liaison de Sp1 et de BTE facilite la liaison de AhR-Arnt au XRE par une interaction physique augmentant coopérativement l'expression de *CYP1A1* (Kobayashi et al., 1996). Le complexe AhR-Arnt recrute des co-activateurs pour aider à l'activation de la transcription (Kobayashi et al., 1997; Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003; Poellinger, 2000).

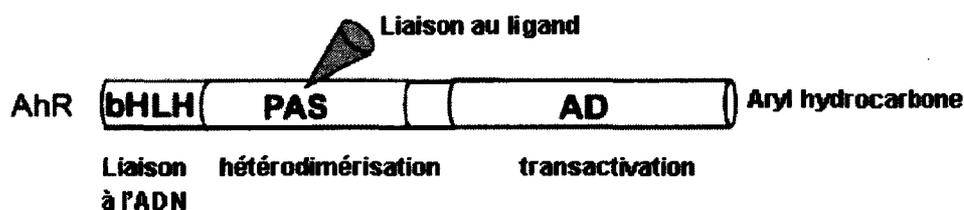


Figure 5: Les domaines fonctionnels de AhR (Adapté de (Ohtake et al., 2009)). bHLH (basic helix-loop-helix), PAS (Per-Arnt-Sim domain), AD (activation domain).

Co-régulateurs de AhR

Il est maintenant bien connu que les facteurs de transcription recrutent des complexes protéiques contenant des co-régulateurs négatifs ou positifs. La régulation de la transcription requiert un recrutement ordonné des co-régulateurs et une coordination de leurs activités. Les co-régulateurs régulent une variété de fonctions incluant le remodelage de la chromatine, la stabilisation des GTF, l'élongation et la maturation de l'ARN, la traduction et la terminaison de la transcription (Ju et al., 2006; O'Malley, 2007; Yu et al., 2007). Pour un facteur de transcription, les co-régulateurs requis peuvent différer selon le type cellulaire utilisé et selon le gène. De plus, *CYP1A1* et *CYP1B1* ont des expressions différentes selon les tissus et leurs transcrits sont régulés différemment par le TCDD dans plusieurs lignées cellulaires (Shimada et al., 1996; Uno et al., 2008).

Des travaux ont été faits sur des cellules d'hépatomes de souris (Hepa-1) et le ligand de AhR le plus étudié, le TCDD. Des expériences de ChIP ont montré que la famille des co-activateurs HAT p160 SRC-1 (*steroid receptorcoactivator 1*), NCoA-2 (*non-p160-related coactivator*) et p/CIP (*p300/CBP cointegrator protein*, SRC-3) s'associent avec la région de l'amplificateur du gène *CYP1A1* après traitement au TCDD (Beischlag et al., 2002; Kumar and Perdew, 1999). SRC-1, NCoA-2, mais pas p/CIP peuvent interagir avec Arnt alors que AhR peut interagir avec les trois cofacteurs (Hankinson, 2005). Des expériences subséquentes ont utilisé les cellules MCF7 dans lesquelles, contrairement aux cellules Hepa-1, les gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* sont induits par le TCDD. Des expériences de ChIP ont mis en évidence le recrutement de la famille des co-activateurs HAT p160 à l'amplificateur et au promoteur des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Le co-activateur p300, connu pour son activité HAT, est recruté à l'amplificateur du gène *CYP1A1* dans les cellules Hepa-1 ainsi qu'à l'amplificateur et au promoteur des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* dans les cellules MCF-7. L'activation de la transcription pour certains gènes requiert l'activité de complexes protéiques utilisant l'ATP pour diminuer l'interaction histone-ADN et remodeler la chromatine. Certains de ces complexes contiennent Brg-1 (*Brahma/SWI2-related gene 1 protein*) (une sous unité d'un facteur de remodelage de la chromatine de SWI/SNF) comme leur sous-unité ATPase. Dans les cellules Hepa-1, Brg-1 augmente l'expression de *CYP1A1* et son effet s'additionne à celui de SRC-1. Les mutants de Brg-1 sont incapables de stimuler l'expression de *CYP1A1*. Brg-1 est essentiel pour l'activation de *CYP1A1* et interagit avec AhR par le domaine de transactivation de ce dernier (Wang and Hankinson, 2002). Dans les cellules MCF-7, Brg-1 est recruté à l'amplificateur et au promoteur des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1*. Le TCDD induit un plus grand recrutement de BRG-1 au gène *CYP1A1* par rapport au gène *CYP1B1*, mais le recrutement des autres co-activateurs est semblable (Taylor et al., 2009). SRC-2, p300 et BRG-1 sont tous requis pour l'induction maximale de *CYP1A1* alors qu'uniquement SRC-2 et p300 sont requis pour l'induction maximale de *CYP1B1* dans les cellules MCF7. De plus, au gène *CYP1A1*, p300 et BRG-1 ont des effets additifs contrairement à SRC-2 et BRG-1 (Taylor et al., 2009). D'autres études ont montré que BRCA1 (*Breast cancer 1*) est important pour l'activation de la transcription des gènes *CYP1A1* et *CYP1B1* par AhR dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses mammaires ER positives (Kang et al., 2006). BRCA-1 est recruté au

complexe par Arnt. D'autres expériences de CHIP dans les cellules Hepa-1 ont montré le recrutement de Med 220 par AhR après le traitement au TCDD. Dans les cellules Hepa-1, l'ordre de recrutement des co-activateurs a été établi. Le recrutement de AhR et p/CIP à l'amplificateur survient avant le recrutement de p300 et Med220 à l'amplificateur et le recrutement de la Pol II au promoteur (Hankinson, 2005). Dans les cellules Hepa-1, le co-activateur TRIP230 (*thyroid hormone receptor (TR)/retinoblastoma protein(Rb) interacting protein 230*) interagit avec AhR-Arnt (Beischlag et al., 2004). TRIP230, de même que TR et Rb, est recruté au complexe par Arnt (Kang et al., 2006). Il y a moins d'études concernant le recrutement des cofacteurs suite au traitement par les ligands naturels comme le DIM que par le TCDD. Il a cependant été montré, dans les cellules MCF7, que l'activation de AhR par le DIM induit le recrutement de cofacteurs à savoir p300, BRG-1, NCoA-1 au promoteur du gène *CYP1A1* (Hestermann and Brown, 2003).

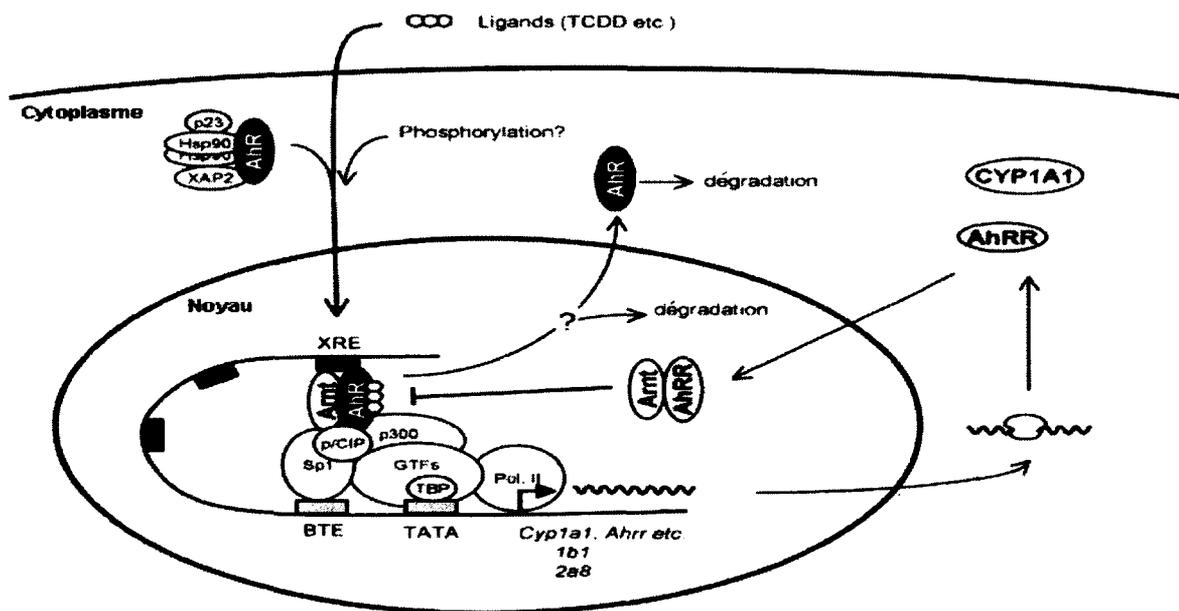


Figure 6: Un modèle de la voie de signalisation de AhR (Adapté de (Fujii-Kuriyama and Mimura, 2005)).

Implication du TCDD dans le cancer du sein

Comme déjà mentionné, certains polluants environnementaux tendent à s'accumuler dans les tissus adipeux et potentiellement causer des effets néfastes. Ils auraient donc un plus grand effet sur les tissus riches en gras comme le tissu mammaire. Pour contrer ces effets néfastes, nous avons des systèmes de détoxification assurés, entre autres, par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, dont les cytochromes P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*...) (Hasler, 1999; Nelson, 1999). Ces enzymes sont régulés par le récepteur AhR qui lie les xénobiotiques. Le TCDD est le ligand le plus fort de AhR (Poland and Knutson, 1982). Il est hautement toxique et présent de manière ubiquitaire dans l'environnement dû à sa résistance à la dégradation. Il tend alors à s'accumuler dans l'environnement, les animaux, et les humains (Baccarelli et al., 2005; Bertazzi et al., 2001; Chen et al., 2003; Domingo et al., 2002; Lee et al., 2006).

L'accident industriel d'une usine de fabrication d'herbicides, survenu en 1976 à Seveso a monopolisé l'attention autour du TCDD. À des doses voisines du microgramme par Kg, le TCDD est toxique chez les animaux se traduisant par une importante perte de poids, l'atteinte des fonctions de défense immunitaire et de reproduction ainsi que la mort des animaux. Le programme national de toxicologie et l'IARC (agence internationale de recherche sur le cancer) ont classé le TCDD comme étant un agent cancérigène humain (IARC, 1997; National Toxicology Program, 2006). Le rôle du TCDD dans l'initiation de la tumeur semble être dépendant du contexte cellulaire. Une corrélation positive a été démontrée entre l'exposition aux polluants et le développement du cancer du sein chez le rat (Brown et al., 1998; Fenton et al., 2002)

Inhibition de la prolifération cellulaire par le TCDD

Vers la fin des années 80, des études dans les cellules MCF7, ont montré que le TCDD inhibe la prolifération cellulaire induite par l'E2 (œstrogène) (Gierthy et al., 1987; Gierthy and

Lincoln II, 1988). Le TCDD inhibe la prolifération des cellules cancéreuses mammaires de même que la croissance de la glande et sa différenciation *in vivo* (Nandi et al., 1995). Le traitement au TCDD résulte en une diminution significative du poids utérus-ovaire qui pourrait être la conséquence de l'effet anti-œstrogénique (Safe et al., 1991). Des études subséquentes ont montré que le TCDD et d'autres agonistes de AhR inhibent l'expression de plusieurs gènes et protéines induites par l'E2 incluant la cathepsine D, c-fos, pS2, PR et la cycline D1 (Duan et al., 1999; Gillesby et al., 1997; Harper et al., 1994; Wang et al., 2001; Wang et al., 1998). Cela induit une diminution de la prolifération cellulaire. Les cellules MDA-MB-468, qui sont ER α négatives et expriment un AhR fonctionnel, ont une croissance inhibée par le TCDD due à l'induction du TGF α (*transforming growth factor*) (Wang et al., 1997). Il y a cependant une plus forte inhibition de la croissance des cellules ER α positives (Lin et al., 2007).

Le TCDD inhibe la progression du cycle cellulaire induite par l'E2 en bloquant la transition G1-S dans une voie qui diminue la phosphorylation de la protéine RB et l'activité de la CDK-2 (*cyclin-dependent kinase 2*) et la CDK-4 (Narasimhan et al., 1991). L'activité inhibitrice de la croissance cellulaire par le TCDD pourrait être expliquée en partie par l'inhibition de plusieurs voies clefs impliquées dans la transition G1-S dépendante de l'hormone dans les cellules MCF7. De plus, le TCDD inhibe la prolifération cellulaire dépendante des androgènes dans les cellules de prostate (Barnes-Ellebe et al., 2004). AhR a une fonction E3 ubiquitin ligase induisant à la dégradation de ER α (Ohtake F et al, 2007), ce qui diminue le niveau de ER α dans les cellules et induit une sous-expression des gènes de la prolifération cellulaire dépendants de ER α (figure 11). Les mécanismes d'inhibition de la signalisation de ER α par AhR vous seront exposés par la suite.

Génération de produits génotoxiques par le TCDD

De plus en plus d'études sont réalisées dans le but de savoir comment le TCDD exerce son effet cancérigène. Le TCDD est mutagène *in vivo*, mais n'est pas directement génotoxique (Dragan and Schrenk, 2000). Bien que des mutations génétiques puissent apparaître suite à

l'exposition au TCDD, ce dernier n'est pas métabolisé en des produits liant l'ADN. Au lieu de réagir directement avec les macromolécules cellulaires, la toxicité du TCDD est médiée par des perturbations de voies de signalisation ou la production de produits secondaires toxiques capables de réagir avec l'ADN (Knerr and Schrenk, 2006; Viluksela et al., 2000).

Il a été suggéré que l'activation de AhR par le TCDD suivie de l'altération de l'expression génique, du stress oxydatif et de la promotion de tumeurs, peut être responsable de la cancérogénicité du TCDD (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003; Poland and Glover, 1979; Wassom et al., 1977). Des évidences montrent que le TCDD induit des dommages à l'ADN et des anomalies chromosomiques (Iannuzzi et al., 2004; Park et al., 1996). L'interaction entre TCDD et AhR ainsi que l'activation subséquente des cytochromes P450, *CYP1A1* et *CYP1B1* contribuent de manière significative à l'induction de la formation de ROS (espèces réactives oxygénées) et la promotion du cancer du foie (Chen et al., 2004; Moennikes et al., 2004; Viluksela et al., 2000). Il est connu que les stress oxydatifs sont capables d'induire des lésions à l'ADN pour générer des bases oxydées, des sites abasiques, de même que des brisures d'ADN simple brin (Breen and Murphy, 1995). Ces brisures d'ADN peuvent induire des mutations qui vont altérer l'expression génique et peuvent ainsi jouer un rôle important dans l'initiation et la progression de cancers. L'exposition au TCDD résulte en la production de ROS, en la peroxydation des lipides et aux dommages à l'ADN dans le cerveau des souris et rats qui ont ingéré du TCDD (Hassoun et al., 2004). Le traitement des rats au TCDD résulte en une augmentation remarquable de 8-oxo-dG (*8-oxo-deoxyguanosine*) dans le foie qui est un marqueur du dommage oxydatif à l'ADN. Il y a une corrélation entre la formation de 8-oxo-dG et l'induction du cancer du foie par le TCDD (Wyde et al., 2001). Cet effet est plus prononcé avec le co-traitement au TCDD et à l'E2 (Wyde et al., 2002). Ces évidences suggèrent que l'induction des enzymes CYP pour donner des oxydants et la formation des dommages oxydatifs à l'ADN pourrait contribuer à la cancérogenèse induite par le TCDD (Knerr and Schrenk, 2006). La génération des ROS par le TCDD et l'activation subséquente de PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymérase 1), enzyme qui médie la réponse cellulaire aux brisures de l'ADN, pourraient aussi contribuer à l'effet cancérigène par le TCDD dans les

cancers du sein (Lin et al., 2007). Dans ces cellules, on observe une augmentation du nombre de brisures de brins d'ADN suite à l'exposition au TCDD (Lin et al., 2007).

De plus, dans les cellules ER positives, le TCDD augmente le ratio 4-OHE2/2-OHE2 (Coumoul et al., 2001). Le 2-OHE2 a un rôle inhibiteur sur la prolifération cellulaire. Le 4-OHE2, quant à lui, forme des produits dépurinés sur l'ADN et pourrait donc être génotoxique (Cavalieri et al., 1997; Cavalieri et al., 2000; Cavalieri and Rogan, 2004). Ce métabolite sera plus amplement discuté par la suite.

Effet du DIM sur le cancer du sein

De plus en plus d'études montrent la présence des composés bioactifs dans les plantes. Des expériences ont mis en évidence le rôle bénéfique des composés bioactifs, dérivés de l'ingestion de légumes du genre *Brassica* (brocoli, choux fleur, etc.), dans plusieurs cancers (Chen et al., 1998; Kirsh et al., 2007; Terry et al., 2001). Parmi ces composés, le DIM est généré dans l'environnement acide de l'estomac après la dimérisation du I3C (indole-3-carbinol) présent dans ces plantes. Après la consommation des végétaux du genre *Brassica*, l'enzyme myrosinase est libérée des plantes, il clive le glucobrassicin en I3C. Ce dernier se dégrade en condition aqueuse pour donner l'ion idolinium. Cet ion réagit dans l'estomac avec le I3C pour donner des oligomères comme le DIM (figure 7). Le DIM est le composé bioactif prédominant qui médie les effets biologiques des aliments du genre *Brassica* ((Reed et al., 2006). Le DIM est un composé lipophile comme le TCDD. C'est un agoniste naturel de AhR et peut donc induire les CYP (Wortelboer et al., 1992). Le DIM peut inhiber la croissance des cellules tumorales mammaires. Cette inhibition est médiée par plusieurs voies de signalisation compromettant la prolifération cellulaire. Le DIM inhibe la prolifération cellulaire induite par les hormones (De Kruif et al., 1991; Kojima et al., 1994). Il inhibe aussi la formation de la tumeur mammaire (Wattenberg and Loub, 1978). Le DIM est utilisé comme agent thérapeutique dans le cancer du sein (Terry et al., 2001). L'administration orale du DIM en dose unique suivi du traitement anticancérogène réduit l'incidence et la multiplicité de tumeurs

mammaires induites par le DMBA (7,12 dimethylbenz(a)-anthracene) de 70-80% chez le rat (Wattenberg and Loub, 1978). Une étude a suggéré que les femmes qui consomment 1 à 2 doses de légumes *Brassica* par jour ont une réduction de 20-40% de risque de cancer du sein comparativement à celles qui consomment peu de ce groupe de légumes dans leur alimentation (De Kruif et al., 1991; Terry et al., 2001).

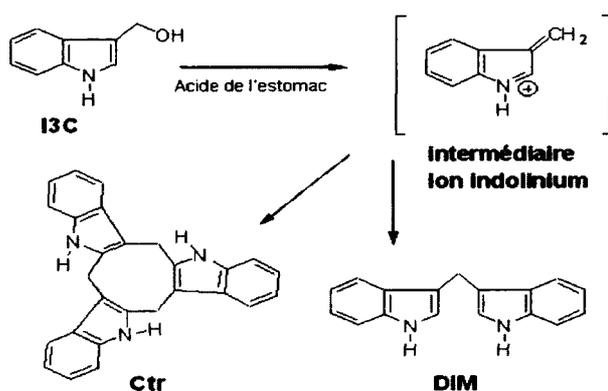


Figure 7: Structure du I3C et des deux produits de la réaction acide; Le DIM et le Ctr (tiré de <http://www.diindolylmethane.org/formation.htm>).

Inhibition de la prolifération cellulaire par le DIM

Le DIM induit l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Chen et al., 1998; McGuire et al., 2006) et inhibe la croissance de ces cellules chez les souris athymiques (Chang et al., 2005). La prolifération des cellules passe par les phases du cycle cellulaire; G1, S, G2, M. Ces phases sont contrôlées par des CDK qui sont associés avec des CDKI (CDK inhibitors). Le DIM cause l'arrêt du cycle cellulaire en G1 dans plusieurs cas de cancer incluant le cancer du sein (Chang et al., 2005; Choi et al., 2009). Des analyses subséquentes montrent que cet arrêt du cycle cellulaire est dû à une réduction de l'activité du CDK-2 par un mécanisme qui implique une surexpression du CDKI p21Cip1/Waf1 (Gong et al., 2006; Hong et al., 2002). De plus, le DIM peut rapidement induire la production de ROS dans les cancers du sein. La production de ROS entraîne l'activation de la voie induite par le stress, impliquant p38 et c-jun-NH2, augmentant l'effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. Chez les cellules

cancéreuses ovariennes, la formation de ROS, médiée par le DIM, est essentielle pour l'induction de l'apoptose des cellules (Kandala and Srivastava, 2010). Dans ce cas, l'induction de ROS par le DIM, contrairement au TCDD, ne semble pas induire d'effets mutagènes. Le DIM peut stimuler et augmenter l'expression de l'IFN γ dans les cellules cancéreuses ce qui est médié par l'activation des voies JNK et p38 (Xue et al., 2005). L'IFN γ joue un rôle dans la prévention du développement de cancer. Ce qui constitue un aspect de plus pour le rôle antitumoral du DIM. Le DIM peut aussi inhiber la liaison du facteur de transcription nucléaire- kB (NF-kB) à l'ADN dans les cellules cancéreuses mammaires ce qui induit l'arrêt de la croissance cellulaire (Rahman et al., 2007; Wang et al., 2008). En effet, NF-kB régule les gènes pour promouvoir la croissance des cellules cancéreuses. De plus, le DIM inhibe l'angiogenèse et l'invasion des cellules en réprimant l'expression de *matrix metalloprotéine-9* et *urokinase-type plasminogen activator* (Kong et al., 2007).

Génération de métabolites chimioprotecteurs par le DIM

Des études ont montré que le 2OH-E2 serait plus présent dans les urines des femmes qui ont eu un supplément de DIM comparativement aux femmes qui ont reçu un placebo (Dalessandri et al., 2004; Terry et al., 2001). Ce métabolite de l'estrogène aurait un effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire (Fotsis et al., 1994). Ce métabolite sera plus amplement par la suite.

ER α (Estrogen Receptor α)

L'œstrogène est une classe d'hormone sexuelle qui est synthétisée à partir du cholestérol. Cette hormone possède plusieurs effets biologiques comme la différenciation sexuelle des femmes et leur développement. L'œstrogène est le régulateur clé de la croissance et la différenciation de plusieurs tissus incluant le système nerveux central et la glande mammaire (Couse and Korach, 1999; Pettersson and Gustafsson, 2001). Il possède plusieurs formes structurales, cependant, la prédominante est le 17 β -estradiol (E2). L'effet de l'E2 est dirigé par la liaison de l'hormone à son récepteur. Il y a deux types de récepteurs d'œstrogène, ER α et

ER β . Ces derniers sont codés par des gènes différents situés dans différents chromosomes. ER α est localisé au 6q25.1 alors que ER β est localisé au 14q23 (Enmark et al., 1997; Gosden et al., 1986). Ces deux sous-types de récepteurs agissent différemment dans plusieurs cellules et tissus répondant à l'estrogène (Dahlman-Wright et al., 2006; Harris, 2007). Cette étude s'intéresse particulièrement à ER α . Ce dernier est le récepteur qui est le plus exprimé dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 (Register and Adams, 1998). ER α fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, plus particulièrement de la famille des récepteurs stéroïdiens qui agissent comme des facteurs de transcription régulés par des ligands (Beato, 1989; Evans, 1988). La portion N-terminale (domaine A/B) du récepteur joue un rôle dans l'interaction protéine-protéine et dans l'activation de la transcription du gène. Le domaine DBD (*DNA binding domain*), aussi connu sous le nom de domaine C, dirige la dimérisation du récepteur et la liaison à l'ADN. Le domaine D, qui agit comme charnière et contribue à la dimérisation du récepteur, est le domaine de liaison à la protéine Hsp (*heat-shock protein*). Le domaine C-terminal, ou domaine E, contient le LBD (*ligand binding domain*) qui reconnaît et lie E2, et coopère avec de domaine A/B pour réguler la transcription du gène (Ascenzi et al., 2006) (Figure 8).

Deux différentes fonctions d'activation de la transcription (AF) ont été identifiées pour ER α . La région AF-1 est localisée dans la portion N-terminale (domaine A/B). Elle est capable de réguler la transcription du gène en absence de ligand, dépendant de la phosphorylation de ER α . Aussi, la région C-terminale AF-2 médie l'activation de la transcription dépendante du ligand. Les deux AF coordonnent la transcription du gène en dictant le profil d'association de ER α avec des co-régulateurs (Lonard and O'Malley, 2007; O'Malley and Kumar, 2009) (figure 8).

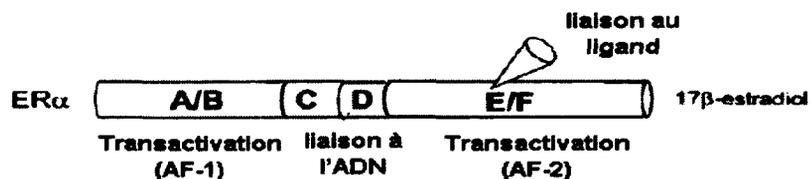


Figure 8: Les domaines fonctionnels de ER α (Adapté de (Ohtake et al., 2009)). Domaine A/B, domaine C et D, domaine E/F

Mécanisme d'activation des gènes cibles de ER α

L'E2 diffuse à travers la membrane plasmique pour se lier à ER α . Il y a deux types de signalisation par ER α , la signalisation génomique et non génomique. La signalisation non génomique ne sera pas abordée, car elle ne fait pas partie de mes travaux. Dans la signalisation génomique, l'E2 se lie à ER α dans le cytoplasme induisant un changement de conformation du récepteur (Powell et al., 2010). Ce changement de conformation cause sa dissociation des protéines chaperonnes et la translocalisation du récepteur dans le noyau. Dans ce compartiment, il y aura la dimérisation du récepteur et l'activation du domaine transcriptionnel du récepteur (Hall et al., 2001; Nilsson et al., 2001). ER α se lie à l'ADN sous forme de dimère (homodimère ER α -ER α ou hétérodimère ER α -ER β) au niveau de son élément de réponse (ERE) présent sur le promoteur ou l'amplificateur de ses gènes cibles (figure 9). Le ERE est une séquence consensus de 13-pb palindromique contenant 2 répétitions inversées de 5'-GGATC-3' séparées par 3pb. La liaison de ER α au ERE résulte en une courbure de l'ADN au niveau du sillon majeur (Nardulli and Shapiro, 1992; Nardulli et al., 1993; Nardulli et al., 1995; Potthoff et al., 1996). Cette courbure de l'ADN semble être importante pour des procédés médiés par des complexes multiprotéiques incluant la transcription (Kerppola and Curran, 1997). De plus, d'autres gènes n'ayant pas de ERE peuvent être régulés par ER α . Ceci nécessite un second facteur de transcription comme AP1 et SP1 lié à l'ADN pour servir d'intermédiaire entre ER α et l'ADN (Safe and Kim, 2008) (figure 9). Ce mécanisme est appelé « interaction croisée » (Göttlicher et al., 1998). Il y a 35% des gènes répondant à l'estrogène qui sont transcrits par la liaison indirecte de ER α au promoteur (O'Lone et al., 2004). Dans les 2 cas, l'interaction de ER α avec l'E2 active la transcription de ses gènes cibles par le recrutement des GTF et des co-régulateurs (Ascenzi et al., 2006; Glass and Rosenfeld, 2000; Lonard and O'Malley, 2007; McKenna and O'Malley, 2002; O'Malley and Kumar, 2009). Nous discuterons de ces différents co-régulateurs.

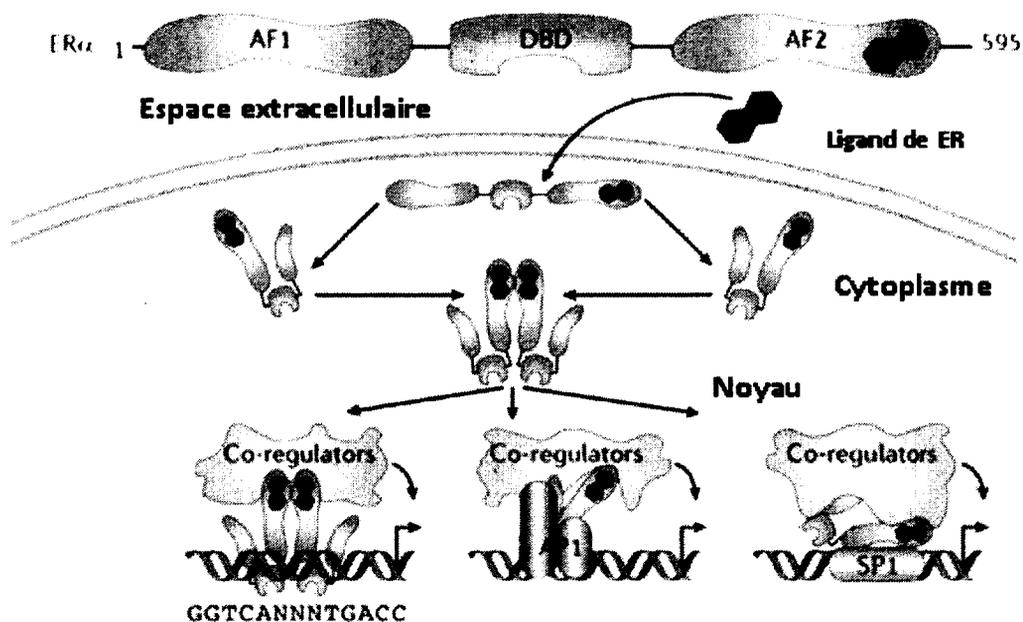


Figure 9: Voie de signalisation génomique de ER α (Adaptée de (Nilsson et al., 2011)).

Co-régulateurs de ER α

Les récepteurs nucléaires interagissent avec des protéines régulatrices qui modulent leur activité de manière positive (co-activateurs) ou négative (co-répresseurs) (McDonnell and Norris, 2002). Après la liaison de ER α à son ligand, il y a un changement de conformation du récepteur exposant le site de liaison aux co-régulateurs (Paige et al., 1999; Shiao et al., 1998). ER α doit interagir avec des protéines co-régulatrices pour former une plateforme à partir de laquelle d'autres protéines s'ajoutent (McKenna and O'Malley, 2002; Smith and O'Malley, 2004). Les co-régulateurs interagissent avec ER α par leurs motifs riches en leucine (L), LXXLL (McKenna et al., 1999). La liaison de ER α à la chromatine requiert la présence de cofacteurs qui peuvent assister ER α à trouver son site de liaison. La protéine FOXA1 (*Forkhead box protein A1*) est un facteur pionnier qui joue un rôle dans le contrôle de près de 50 % des gènes répondant à l'E2 (Mehta et al., 2012). Les co-activateurs facilitent l'activité transcriptionnelle de ER α en augmentant les modifications sur la chromatine (CBP/p300,

PRMT1, SWI/SNF), l'activation de la Pol II, et en servant d'intermédiaire entre ER α et la machinerie transcriptionnelle basale (Ascenzi et al., 2006). Les co-répresseurs, quant à eux, empêchent ER α d'induire la transcription génique (Jepsen and Rosenfeld, 2002).

La famille des co-activateurs p160 fait parti des premiers facteurs à être recrutés par ER α (Heery et al., 1997). Elle constitue la famille la plus caractérisée des co-activateurs de ER α (Anzick et al., 1997; Hong et al., 1997; Onate et al., 1995). Les trois membres sont : SRC1 (NCOA1), SRC2 (NCOA2, Tif2, GRIP1) et SRC3 (NCOA3, AIB1). Ces trois membres augmentent l'activité transcriptionnelle de ER α de manière dépendante du ligand. Les membres de la famille p160 possèdent une activité HAT. L'acétylation, comme déjà mentionné, permet la neutralisation des charges positives des lysines diminuant les interactions histone-ADN menant à une accessibilité de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine (Klinge, 2000).

Après de recrutement des co-activateurs p160 par ER α , les protéines p160 peuvent interagir avec les co-activateurs p300 et CBP (Demarest et al., 2002; Kamei et al., 1996). Ces derniers possèdent une activité HAT (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). P300 et CBP peuvent tous les deux interagir aussi bien avec la famille p160 et ER α de manière ligand dépendante (Kamei et al., 1996; Kraus and Kadonaga, 1998). Les co-activateurs p160 contiennent plusieurs domaines fonctionnels qui permettent l'interaction avec les récepteurs nucléaires et les associations avec d'autres co-activateurs (Xu and O'Malley, 2002; Xu et al., 2009). P300 et CBP pourraient recruter d'autres protéines avec une activité HAT comme p/CAF et GCN5L2 (hGCN5), qui ensemble, augmentent l'activité transcriptionnelle. Les co-activateurs p160 peuvent aussi recruter des HMT, CARM1 (PRMT4) et PRMT1, au ER α pour faciliter la transcription des ses gènes cibles (Métivier et al., 2003). L'activité transcriptionnelle de ER α implique aussi le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine ATP dépendant SWI/SNF (composé de BRG1, hBRM, BAF60B et SNF5) qui cible les promoteurs en interagissant avec la famille des co-activateurs p160 (Belandia et al., 2002). TIF α interagit avec ER α de manière ligand dépendant. TIF1 α (*TRIM24*) possède une activité kinase intrinsèque qui permet une phosphorylation sélective des membres de la machinerie

transcriptionnelle basale (Fraser et al., 1998). TIF α est un membre d'une famille de protéines contenant un domaine N terminal RBCC (*RING finger-B boxes coiled coil*) et un bromodomaine en C terminal (Le Douarin et al., 1998).

Peu de co-répresseurs de ER α ont été identifiés. Les deux majeurs sont : NCOR1 et SMRT (NCOR2). Ils interagissent avec ER α lié au tamoxifène (Liu and Bagchi, 2004; Shang et al., 2000). Ces protéines fonctionnent comme des adaptateurs pour recruter des HDAC (Keeton and Brown, 2005). Ces dernières promeuvent la condensation de la chromatine induisant la répression transcriptionnelle (Li et al., 2000; Xue et al., 1998). L'association entre ER α -tamoxifène, NCOR1 et SMRT résulte en une interaction avec HDAC3, HDAC1 et le complexe NURD (Liu and Bagchi, 2004).

Implication de l'estrogène dans le cancer du sein

L'E2 est impliqué dans plusieurs pathologies telles que le cancer endométrial et le cancer du sein (Henderson et al., 1988). Une forte corrélation a été établie entre la dose d'E2, la durée d'exposition et l'augmentation du risque de cancer du sein (Henderson et al., 1988; Toniolo et al., 1995). L'E2 a été classé comme étant une hormone cancérigène par l'IARC (IARC, 1987; IARC, 1999). Il y a 70% des tumeurs mammaires qui dépendent de l'effet stimulateur de l'E2 (Osborne, 1998). Des thérapies qui ciblent l'E2 ou son récepteur ont montré une réduction significative de la récurrence des tumeurs mammaires redondantes à l'E2 (Fisher et al., 2005).

Trois mécanismes majeurs ont été postulés concernant l'effet cancérigène de l'E2 : la stimulation de la prolifération cellulaire médiée par la liaison au récepteur, l'effet génotoxique direct en augmentant le niveau de mutation par l'activation métabolique médiée par le cytochrome P450 et par l'induction d'aneuploidie (Russo and Russo, 2006). On va discuter plus en détail des deux premiers mécanismes.

Induction de la prolifération cellulaire par l'estrogène

Dans la glande mammaire, l'E2 promeut la prolifération cellulaire aussi bien dans les tissus sains que transformés. Le mécanisme le plus reconnu de la cancérogénicité de l'E2 est par la liaison à son récepteur (ER α) ce qui constitue un signal qui va augmenter la production des facteurs de croissance en activant la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Russo and Russo, 1999). Dans les cellules MCF7, l'E2 stimule la surexpression des facteurs de croissance comme MAPK, PI3K et Akt (Levin, 2003; Shupnik, 2004). PI3k et Akt sont impliqués dans la survie cellulaire. Ils induisent des gènes dont les produits inhibent la machinerie apoptotique (Dutta et al., 2006). L'E2 peut aussi stimuler la famille des facteurs de transcription STAT impliquée dans la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse (Yu and Jove, 2004). Dans les cellules cancéreuses mammaires, l'E2 augmente directement la croissance des cellules en culture en augmentant le nombre de cellules G0/G1 entrant dans le cycle cellulaire (Dickson and Lippman, 1995; Doisneau-Sixou et al., 2003). L'E2 augmente l'expression de la cycline D1 et de c-myc qui peuvent entraîner la transition G1/S (Foster et al., 2001). Ces deux facteurs promeuvent la progression du cycle cellulaire en diminuant l'association entre le complexe cycline E/CDK2 et deux inhibiteurs de CDK, p21Cip1/WAF1 et p27Kip1 (Cariou et al., 2000; Doisneau-Sixou et al., 2003; Foster et al., 2001). La cycline D1 agit aussi en permettant l'hyperphosphorylation de la protéine RB par la CDK4 et la CDK6. Cette phosphorylation résulte au passage des cellules de G1 à S (Sherr, 1996). ER α se lie à p27 pour le séquestrer dans le cytoplasme inhibant ainsi l'effet répresseur de p27 sur la progression du cycle cellulaire (Beato and Klug, 2000). L'E2 active aussi rapidement le complexe cyclin E-CDK2 accélérant la transition G1/S (Foster and Wimalasena, 1996). La signalisation par l'E2 induit la surexpression de protéines antiapoptotiques incluant Bcl-2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Crawford et al., 2010; Nehra et al., 2010).

Génération de métabolites génotoxiques par l'estrogène

L'exposition à l'E2 induit des altérations génétiques par plusieurs mécanismes (Roy and Singh, 2004). Les souris *knockout* de ER α surexprimant l'oncogène Wnt-1 développent des tumeurs mammaires. Cela procure une preuve directe que l'E2 cause le cancer du sein de manière génotoxique, indépendante de ER α (Russo and Russo, 1999; Russo and Russo, 2006). L'E2 est éliminé du corps par sa conversion en des métabolites œstrogéniquement inactifs qui seront excrétés dans l'urine et dans les fèces. Le métabolisme de l'estrogène inclut l'oxydation par les enzymes cytochromes p450 (CYP), la glucuronidation par l'UDP-glucuronosyltransférase, le O-méthylation par le O-méthyltransférase (COMT) (Hernandez et al., 1992; Martucci and Fishman, 1993). La première étape dans le métabolisme de l'E2 est l'hydroxylation catalysée par les CYP P450 plus spécifiquement *CYP1A1* et *CYP1B1*. Ces derniers font partie de la superfamille de l'hème contenant la monooxygénase (Nelson et al., 1996). Ce procédé est effectué en majorité dans le foie, car c'est l'endroit où les cytochromes sont le plus exprimés. *CYP1B1* produit le 4-hydroxyestradiol (4OHE2) qui est un métabolite génotoxique. Le 4-OHE2 génère des radicaux libres provenant du cycle d'oxydoréduction avec les formes de quinone et semi-quinone correspondantes, ce qui cause des dommages à l'ADN potentiellement cancérigènes (Nutter et al., 1991; Nutter et al., 1994). Le 4-OHE2 peut oxyder la guanine à la position 8 formant le 8-oxo-dG qui peut mener à la dépurination des bases (Adénine ou guanine) de l'ADN et induire des mutations à l'ADN qui sont potentiellement cancérigènes (Cavalieri et al., 1997). De plus, l'E2 peut induire la génération de ROS sans la formation de 4-OHE2 (Okoh et al., 2011).

Les interactions croisées entre AhR et ER α

Des études ont montré que AhR interagit avec plusieurs voies de signalisation intracellulaires et possède d'autres fonctions que l'induction de ses gènes cible. De telles interactions impliquent NK-KappaB, RB, hypoxie, ER α et d'autres récepteurs aux hormones (Beischlag et al., 2008; Swedenborg and Pongratz, 2010). Les activateurs de AhR produisent

paradoxalement des effets antiœstrogéniques et des effets œstrogènes mimétiques en fonction du contexte cellulaire. Concernant les mécanismes moléculaires par lesquels AhR module l'activité de ER α , aussi bien une interaction directe qu'indirecte a été proposée (Matthews and Gustafsson, 2006; Ohtake et al., 2009; Safe and Wormke, 2003).

Pour ce qui concerne l'interaction indirecte, quelques mécanismes ont été proposés (figure 10). AhR activé par le ligand diminue le niveau de l'E2 en augmentant son métabolisme, en des formes conjuguées, par l'induction des CYP P450 (Spink et al., 1990). Un autre mécanisme est l'inhibition par la liaison de AhR aux XRE présents aux gènes cibles de ER α (Safe and Wormke, 2003). Il y a aussi une compétition entre AhR et ER α , chacun lié à son propre promoteur cible, pour le recrutement des co-activateurs. (Carlson and Perdew, 2002).

L'interaction directe protéine –protéine entre AhR et ER α a été mise en évidence et plusieurs mécanismes ont été proposés (figure 11). La région N-terminale (domaine A/B) de ER α interagit avec le domaine de transactivation (région P/S/T) de AhR (Beischlag and Perdew, 2005; Ohtake et al., 2003). De plus, il a été démontré que Arnt peut également lier ER α . AhR/ER α peut se lier soit au XRE soit au ERE par l'attachement respectif de AhR et de ER α . En absence d'E2, les activateurs de AhR favorisent l'interaction entre AhR-Arnt et les formes libres de ER α , conduisant à la formation d'un complexe capable de se lier au ERE et d'activer les gènes cibles de ER α (Ohtake et al., 2003) (figure 11A). En revanche, en présence de l'E2, ER α se lie au ligand. Dans ce cas le complexe actif AhR-Arnt réprime la transcription des gènes cibles de ER α (figure 11B). De manière réciproque, ER α lié au ligand s'associe à AhR déjà lié au XRE et potentialise (figure 11C) ou réprime (Figure 11D) les gènes cibles de AhR (Beischlag and Perdew, 2005; Matthews et al., 2005). Cependant des études ont suggéré que l'activité répresseuse de ER α sur ses gènes cibles passe par Arnt (Brunnberg et al., 2003). L'activation de AhR est suffisante pour l'interaction avec ER α (Andersson et al., 2002). Ceci suggère que les interactions croisées entre AhR et ER α sont initiées par la stimulation de AhR.

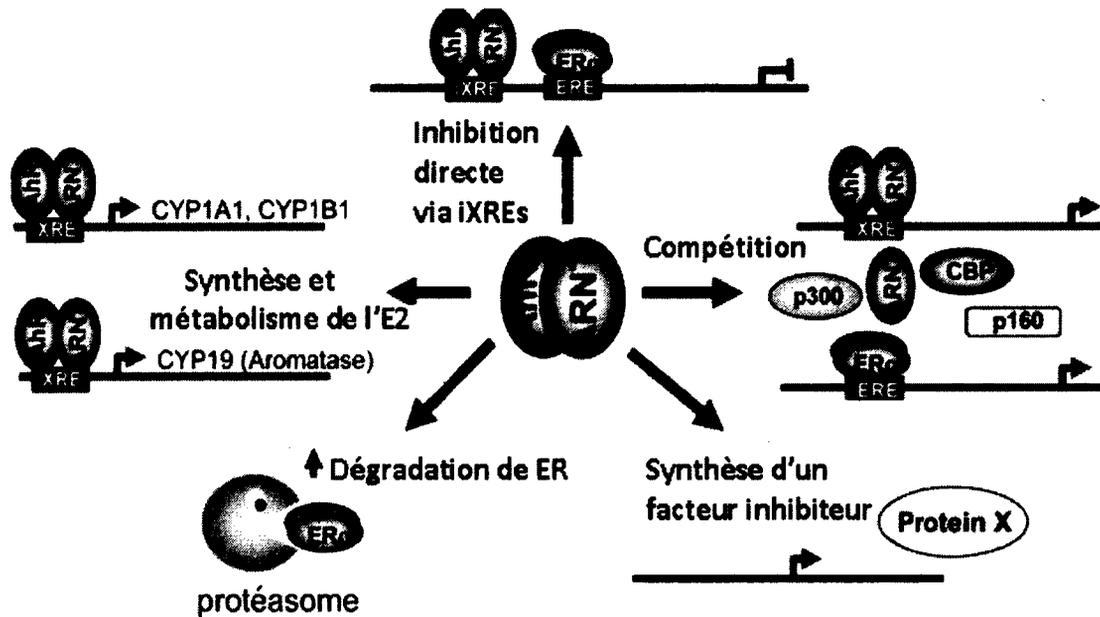


Figure 10: Les mécanismes proposés d'inhibition des gènes cibles de ER α par AhR (Adapté de (Matthews and Gustafsson, 2006)). AhR inhibe l'activité de ER α par différents mécanismes. Inhibition par la liaison de AhR/Arnt au XRE (iXRE) présent aux gènes cibles de ER α ; compétition pour les co-activateurs; synthèse d'une protéine potentiellement inhibitrice; augmentation de la dégradation protéasomale de ER α ; altération de la synthèse de l'E2 et augmentation du métabolisme de ce dernier par l'augmentation de l'aromatase, de l'expression des cytochromes p450, *CYP1A1* et *CY1B1*.

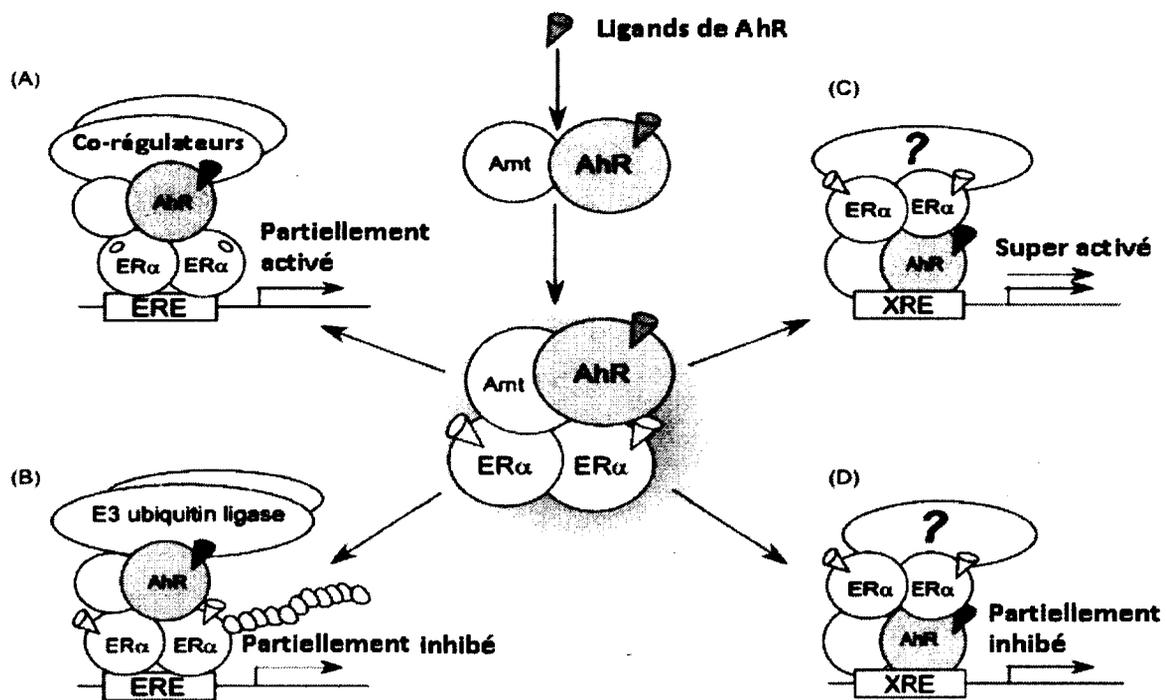


Figure 11: Interactions croisées entre AhR et ER α par association directe (Adapté de (Ohtake et al., 2009)). A) AhR lié au ligand est associé à ER α non lié au ligand et il y a recrutement de co-régulateurs B) AhR lié au ligand forme le E3 ubiquitin ligase qui reconnaît les ER α pour la protéolyse C) AhR lié au ligand s'associe au ER α lié au ligand et active la transcription par le XRE D) l'association de ER α avec AhR résulte en une répression de la transcription par XRE.

Projet de maitrise

Il a été montré, notamment dans le laboratoire, que ER α régule différemment les gènes cibles de AhR (cytochromes p450) en inhibant la transcription de *CYP1A1*, mais n'exerce aucun effet sur *CYP1B1* suite au traitement avec le TCDD (Angus et al., 1999; Beischlag and Perdew, 2005; Coumoul et al., 2001; Kharat and Saatcioglu, 1996; Ricci et al., 1999). Cela diminuerait le ratio *CYP1A1/CYP1B1* et ferait pencher la balance vers une plus grande proportion de 4OH-E2 dont les effets sont mutagènes. Puisque AhR possède plusieurs ligands régulant différemment ses gènes cibles et sur lesquels ER α exerce différents effets, mon projet a consisté à étudier la caractérisation de cette régulation différentielle par le ligand toxique TCDD et le ligand bénéfique DIM ainsi que l'effet de l'E2 sur cette régulation dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7. Ces cellules expriment les deux récepteurs. Afin de caractériser cette régulation différentielle des gènes cibles de AhR par les ligands, les ARNs totaux ont été isolés et soumis à une transcription inverse. Par la suite, une amplification quantitative des ARNm a été faite dans le but d'évaluer le niveau d'expression des gènes cibles de AhR suite au traitement avec les deux ligands à l'étude ainsi que l'effet de l'E2 sur ces gènes. Aussi, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont été réalisées pour mettre en évidence le recrutement de AhR et de ER α au XRE des gènes.

Pour chaque ligand, TCDD et DIM, notre hypothèse est que la régulation différentielle des gènes se fait par un recrutement de différents co-régulateurs à ces gènes. Pour vérifier cette hypothèse, mon but est d'identifier les co-régulateurs impliqués dans la réponse transcriptionnelle induite par l'interaction entre les facteurs de transcription AhR et ER α suite au traitement avec les deux ligands et l'ajout de l'E2. Pour cela, une sédimentation différentielle des extraits chromatiniens sur un gradient de sucrose de 10-40% a été faite. Cela permet de séparer les complexes protéines-ADN selon la taille des complexes protéiques liés à l'ADN. Ainsi, les promoteurs fonctionnellement distincts seront isolés (Tanaka et al., 2007). Les fractions ont été analysées par immunobuvardage de type western pour vérifier la présence des protéines d'intérêt. Le recrutement protéique a été vérifié par

immunoprécipitation de la chromatine. Des fractions d'intérêt seront combinées afin d'immunoprécipiter de plus grandes quantités soit de ER α ou de AhR. Les protéines contenues dans ces immunoprécipitats seront par la suite analysées en spectrométrie de masse.

Ces résultats nous permettront de mieux connaître les mécanismes de régulation génique de AhR et ER α . Aussi, les protéines identifiées (traitement au TCDD) pourraient potentiellement être des cibles thérapeutiques dans le cancer du sein, car leurs inhibitions entraîneraient le rétablissement du ratio *CYP1A1/CYP1B1* dans la cellule.

CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées, MCF7, sont des adénocarcinomes de cellules épithéliales de la glande mammaire qui expriment les récepteurs AhR et ER α . Les cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) supplémenté de 10 % FBS et 1 % PenStrep. Les cellules ont été cultivées à 37 °C, dans un environnement humidifié maintenant une concentration de CO₂ à 5 %. Pour le traitement avec différents produits, le milieu a été changé pour un milieu sans hormones lipidiques et sans rouge de phénol après trois lavages au PBS 1 X. Le rouge de phénol peut mimer les effets de l'E2 (Ernst M et al, 1989). Cette étape sert à sevrer (diminuer le niveau de base) les cellules en E2 et voir l'effet de cette hormone sur l'expression des gènes. Puisque les cellules MCF7 ont une prolifération dépendante de l'E2, le changement de milieu a aussi pour effet de synchroniser les cellules en G1. Les cellules ont été traitées trois jours après le changement de milieu. Le traitement dure 24 h avec 50 μ M de DIM ou avec 10 nM de TCDD pour les essais de RT-qPCR. Pour les essais de ChIP, les cellules ont été traitées avec 50 μ M de DIM pendant 1 h 00 ou avec 10 nM de TCDD pendant 1 h 30.

1.2 ChIP (Immunoprécipitation de la chromatine)

Après différents traitements, 1,1 % de formaldéhyde a été ajouté au milieu de culture pendant 10 min juste après la sortie de l'incubateur (à T° pièce). Le formaldéhyde permet de ponter les protéines à l'ADN et les protéines entre elles. Par la suite, le formaldéhyde a été neutralisé avec de la glycine pour une concentration finale de 125 mM. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS 1 X froid et transférées dans un tube Eppendorff de 1,5 ml à 4 °C. Entre les lavages, les cellules ont été centrifugées 6 min à 4 000 rpm à 4 °C et le surnageant a

été enlevé. Les solutions subséquentement utilisées ont été supplémentées avec 1 mM PMSF et 1X d'inhibiteurs de protéases (200 μ M Pepstatin, 72 μ M Leupeptin, 26 μ M Aprotinin dans de l'éthanol 90 %). Les cellules ont été lavées avec 1 ml de tampon I (0,25 % triton, 10 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes pH 6,5) et incubées 10 min sur glace. Les cellules ont été ensuite lavées avec 1 ml de tampon II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 10 mM Hepes pH 6,5). Le surnageant a été enlevé et une lyse a été faite sur les cellules en utilisant un tampon de lyse froid (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1). 100 μ L de tampon de lyse fraîchement préparé ont été utilisés par IP. Le lysat de cellules a été passé environ 5 fois à la seringue avec aiguille de 23G1. Le lysat a par la suite été incubé à 4 °C pendant 1 h 00 avec agitation. Le volume des échantillons a été ajusté à 1 ml en ajoutant du tampon IP dilution buffer (0,01 % SDS, 1,1 % Triton, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris pH 8,1, 167 mM NaCl). L'échantillon a été soniqué 8 x 10 sec à 65 % d'intensité (sonicateur BRANSON digital sonifier; sonde 102C (C6)) avec une pause sur glace de 3 min entre chaque sonication pour obtenir des fragments d'environ 500 pb. L'échantillon a été centrifugé à 12 000 rpm dans une microfuge (Sigma centrifuge 1-14) pendant 10 min à 4 °C et le surnageant a été récupéré. Les IP ont été réalisées sur 400 μ g d'ADN, un input de 5 % a été prélevé et placé à 4 °C pour chaque traitement. 3 μ l d'échantillon ont été utilisés pour vérifier la fragmentation de l'ADN sur gel. La solution chromatinienne a par la suite été diluée 10 fois avec du IP dilution buffer. Le tout a été préincubé avec 20 μ l de billes protéine A-agarose (Pierce) (avec 5 mg/ml de sperme de saumon) pendant 4 h 00 à 4 °C avec agitation. Les échantillons ont été centrifugés à 1500 rpm pour 2 min et 4 μ g d'anticorps/IP ont été ajoutés sauf pour le contrôle sans anticorps. Le tout a été incubé à 4 °C pendant la nuit avec agitation. 20 μ l de billes ont été ajouté par IP et le tout a été incubé pendant 4 h 00 à 4 °C avec agitation. Plusieurs lavages ont par la suite été faits: 2 X TSE-150 (0,1 % SDS, 1 % Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8,1, 150 mM NaCl), 2 X TSE-500 (0,1 % SDS, 1 % Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8,1, 500 mM NaCl), 2 X LiCl (0,25 M LiCl, 1 % NP40, 1 % DOC, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8,1), 2X TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) et le surnageant a été retiré. Entre les lavages, les échantillons ont été centrifugés à 6 000 rpm pour 30 s dans une microfuge (Beckman Coulter, Microfuge 18). 200 μ L de 1 % SDS, 0,1 M NaHCO₃ ont été ajoutés aux billes de même que l'input. Le tout a été incubé pour 20 min à 65 °C avec

agitation. Les échantillons ont été centrifugés et les surnageants ont été récupérés. Les pontages ont ensuite été reversés en incubant les échantillons à 65 °C pendant la nuit. Les échantillons ont été traités à la RNase A (0,1 µg/µl à 37 °C pendant 1h00) et à la protéinase K (0,51 µg/µl à 60 °C pendant 3 h 00). L'ADN des échantillons a été purifié selon le protocole du kit de purification de produit de PCR de Qiagen (Kit QIAquick PCR purification Kit).

1.3 Sédimentation sur un gradient de sucrose

La méthode a été modifiée de Tanaka et al, 2007. Chaque gradient de sucrose continu de 10-40 % a été fait dans 35 ml de IP dilution buffer en utilisant un FPLC (*Fast protein liquid chromatography*) (AKTA FPLC, amersham pharmacia biotech). Les cellules ont été traitées comme pour les essais de ChIP. Après la sonication, 3 mg de protéines ont été déposés sur chacun des gradients de sucrose. Les gradients ont été centrifugés en utilisant le rotor Beckman SW28 à 24 000 rpm pour 30 h 00. Des fractions de 1,75 ml ont été récupérées du bas vers le haut en perçant le fond du tube recueillant ainsi les fractions les plus denses en premier. Des analyses d'immunobuvardage de type western et de ChIP ont par la suite été réalisées sur ces fractions.

1.4 WB (Immunobuvardage de type Western)

Pour l'analyse des protéines, les fractions ont été incubées pendant la nuit à 65 °C. Le tampon de chargement SDS a par la suite été ajouté à 1 X. Les échantillons ont ensuite été incubés à 95 °C pendant 5 min. Le même volume d'échantillon a été déposé dans les puits d'un gel de 12 % SDS-polyacrylamide. Les protéines ont par la suite été séparées pendant 1 h 20 à 120 V. Les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF pendant 1 h 00 à 50 mA à l'aide d'un appareil de transfert semi-dry. Après un lavage à l'eau, la membrane a été incubée durant la nuit avec l'anticorps contre AhR (polyclonal de lapin, Santa Cruz Biotech sc-5579x) 1/1 000 ou contre Actine (monoclonal de lapin Sigma Aldrich A2066) 1/10 000 dans du TBST (1 % TBS, 0,05 % Tween)-5 % de lait à 4 °C avec agitation. La membrane a ensuite été lavée

2X avec une solution de TBST pour 5 min chaque lavage. Une incubation avec l'anticorps secondaire (lapin 1/10 000 Amersham Biosciences NA934) dans du TBST 5 % de lait à température pièce pendant 1h00 avec agitation a ensuite été réalisée. La membrane a par la suite été lavée 3 x 5 min avec du TBST. Les protéines ont été révélées en utilisant du ECL (*enhanced chemiluminescence*) (Amersham Biosciences) pendant 5 min.

1.5 Extraction d'ARN

L'ARN total des cellules a été isolé à l'aide de la trousse *GenElute* (Sigma Aldrich), selon le protocole fourni par la compagnie. L'ARNm a été inversement transcrit en ADNc par l'action de la transcriptase inverse M-MLV-RT (Promega) en suivant le protocole fourni par la compagnie

1.6 qPCR (PCR quantitatif)

Les échantillons d'ADNc ou d'ADN provenant des essais de ChIP ont été soumis à une amplification quantitative (qPCR) à l'aide de l'appareil de PCR en temps réel Mx3000P (Agilent Technologies). L'ADNc du 36B4 (gène codant pour la protéine ribosomale RPLPO), dont l'expression demeure invariable suite aux différents traitements appliqués aux cellules, a servi à normaliser l'ADNc lors des réactions de qPCR. L'abondance relative des gènes *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* a été calculée après la normalisation avec le 36B4. La formule suivante a été utilisée pour le calcul de l'abondance: $2^{-(ct_{\text{gène testé}} - ct_{36B4})}$. Le *ct* (*cycle threshold*) indique le nombre minimum de cycles nécessaires pour que la quantité d'amplicon soit détectable à un niveau significativement supérieur au bruit de fond.

Pour les échantillons d'ADN provenant des ChIPs, 1 % de l'ADN total utilisé dans l'essai (Input) a servi comme contrôle. La réaction de qPCR a été faite selon une première dénaturation à 95 °C pour 2 min suivies de 35 cycles de 95 °C pour 30 s, 63 °C pour 1 min et

72 °C pour 45 s et une dénaturation finale. La formule suivante est utilisée pour le calcul du recrutement: $2^{-(ct\ IP - ct\ Input)} - 2^{-(ct\ sans\ anticorps - ct\ Input)}$

Tableau 3: Liste des amorces utilisées pour les analyses de RT-qPCR et de ChIP-qPCR

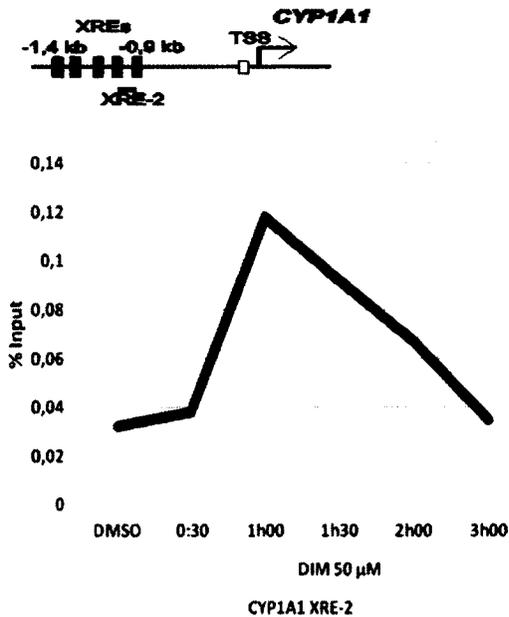
Expérience	Gène	Forward	Reverse
RT-qPCR	<i>36B4</i>	CGACCTGGAAGTCCAACACTAC	ATCTGCTGCATCTGCTTG
	<i>CYP1A1</i>	TGAACCCCAGGGTACAGAGA	GGCCTCCATATAGGGCAGAT
	<i>CYP1A2</i>	CCTCATCCCACAGGAGAAGA	ACATGAGGCTCCAGGAGATG
	<i>CYP1B1</i>	AACGTACCGGCCACTATCAC	CCACGACCTGATCCAATTCT
	<i>AhR</i>	CAGATGCTTTGGTCTTTTATG	GAAATTCAGCTCGGTCTTCG
ChIP-qPCR	<i>CYP1A1</i>	AGCCACACGCAGACCTAGAC	GGGTGGAGGGAGAGGAACT
	<i>XRE-2</i>		
	<i>CYP1B1</i>	ATGACTGGAGCCGACTTTCC	GGCGAACTTTATCGGGTTG
	<i>XRE-2</i>		

CHAPITRE II: RÉSULTATS

2.1 Conditions optimales de traitement au DIM

Les conditions à utiliser pour le traitement au TCDD ont déjà été déterminées par les travaux de Maud Marques dans le laboratoire. Pour les analyses d'expression génique par RT-qPCR, les cellules ont été traitées avec 10 nM de TCDD pendant 24 h 00 alors qu'elles ont été traitées pendant 1 h 30 pour les expériences de ChIP. Puisque c'est la première fois qu'on utilise le DIM dans le laboratoire, il a fallu déterminer les conditions à utiliser pour le traitement des cellules. En premier lieu, une titration du DIM (10 μ M-100 μ M) sur 24 h 00 de traitement a été effectuée afin de déterminer la concentration induisant l'expression maximale des gènes CYP à l'étude. Nous avons observé un effet maximal à une concentration de 50 μ M alors qu'une dose de 100 μ M induit à la fois l'expression de AhR et une forte mort cellulaire (figure non-montrée). Nous avons par la suite décidé d'utiliser la concentration de 50 μ M pour une durée de 24 h 00 (même durée que le TCDD) pour les analyses d'expression génique par RT-qPCR. Pour les conditions à utiliser pour les expériences de ChIP, la concentration de 50 μ M a été utilisée et on a fait une cinétique sur 3 h 00 à intervalles de 30 min. L'analyse a montré que le temps optimal de traitement est de 1 h 00, correspondant à un recrutement maximal de AhR aussi bien au XRE du gène *CYP1A1* qu'à celui du gène *CYP1B1* (figure 12A; B). Pour les expériences de ChIP, les cellules ont été traitées avec 50 μ M de DIM pendant 1 h 00.

A



B

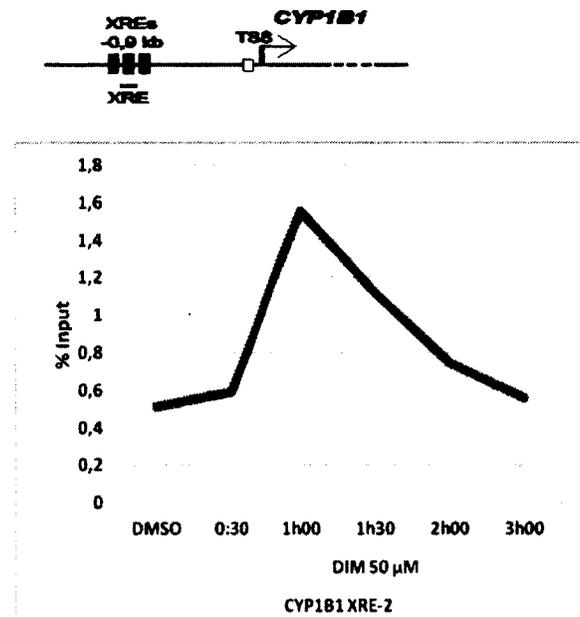


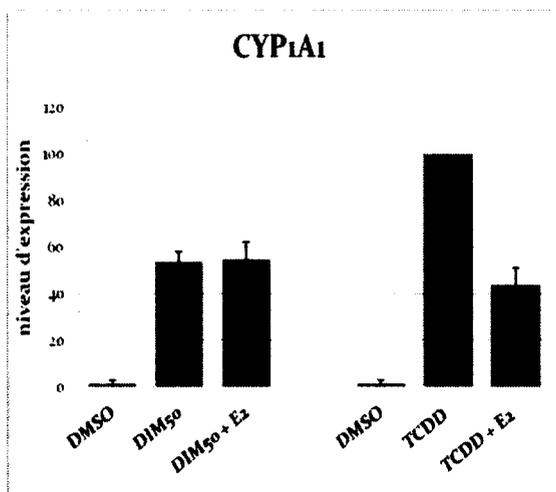
Figure 12: Temps optimal de traitement des cellules pour les essais de ChIP. A) Recrutement de AhR au XRE du gène *CYP1A1* B) Au XRE du gène *CYP1B1*. Pour la détermination de la durée de traitement pour les expériences de ChIP, les cellules ont été traitées avec 50 µM de DIM (concentration préalablement déterminée par RT-qPCR). Les ChIP ont été faits en utilisant l'anticorps anti-AhR. Les ADN ont été analysés par qPCR. Une cinétique sur 3 h 00 à intervalles de 30 min a été faite.

2.2 Expression différentielle des gènes cibles de AhR selon le ligand

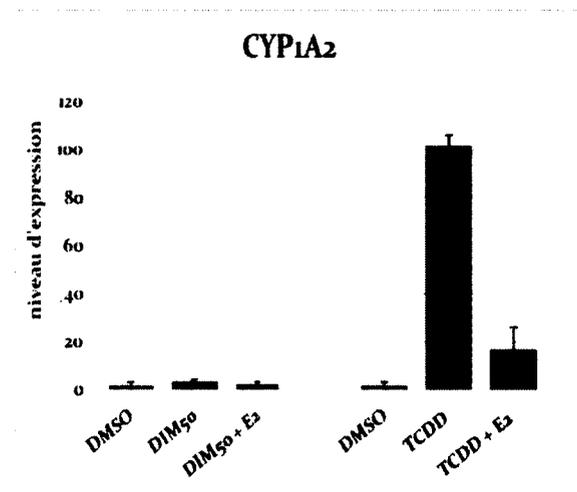
Dans le laboratoire, des expériences ont montré une répression différentielle des gènes cibles de AhR par ERα suite au traitement avec le TCDD. Nous avons donc voulu voir si un traitement au DIM donne les mêmes effets. Un traitement au TCDD induit plus fortement le gène *CYP1A1* qu'un traitement au DIM. À l'ajout de l'E2 (ligand de ERα) on a une répression du gène *CYP1A1* après l'induction au TCDD mais aucune répression n'est observée après l'induction au DIM (figure 13A). Cependant, *CYP1B1* est induit de manière égale par les deux

ligands et l'ajout de l'E2 n'a aucun effet sur cette induction (Figure 13B). L'E2 n'exerce pas d'effet répresseur à ce gène. Le traitement au DIM n'induit pas le gène *CYP1A2* alors que celui au TCDD induit le gène. L'ajout de l'E2 induit une répression du gène après l'induction au TCDD (Figure 13C). Les résultats montrent une expression différentielle des gènes cibles de AhR et un effet différent de l'E2 sur les gènes selon le ligand. Le gène *AhR* est utilisé pour s'assurer que les différences transcriptionnelles observées entre les différents ligands ne puissent pas être attribuées à des variations dans l'expression du récepteur (AhR). Le gène ne varie pas significativement entre les traitements (Figure 13D).

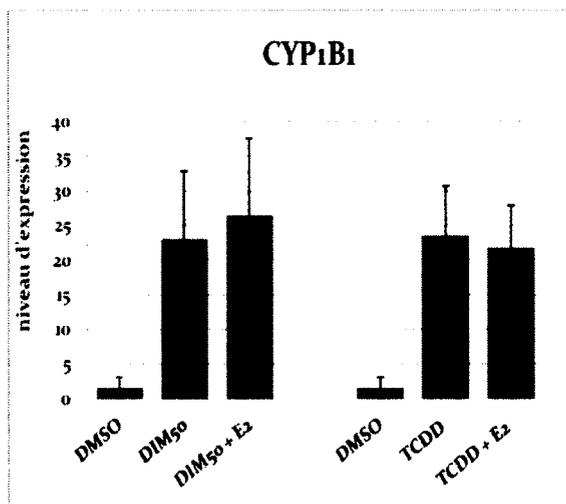
A



C



B



D

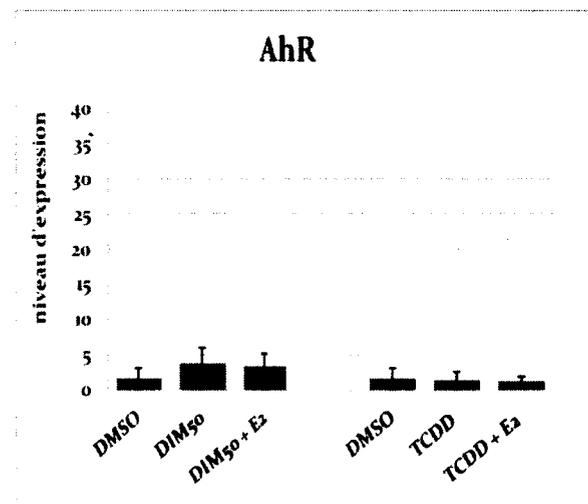
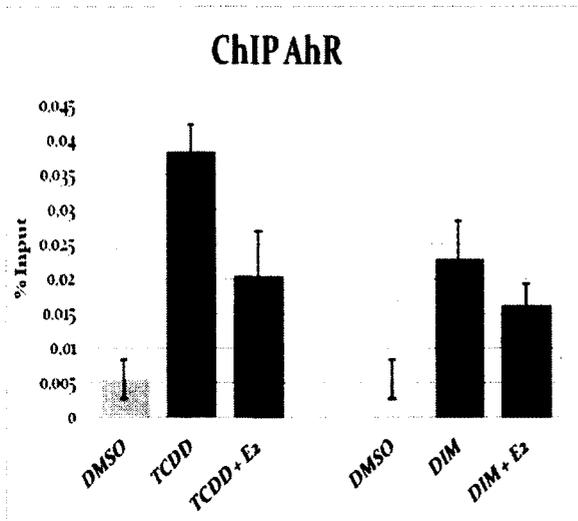
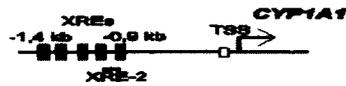


Figure 13: Induction des gènes cibles de AhR après le traitement au ligand TCDD ou au DIM et le co-traitement avec l'E2. A) Effet des différents traitements au gène *CYP1A1* B) Au gène *CYP1B1* C) Au gène *CYP1A2* D) Au gène *AhR*. Les cellules ont été traitées avec 50 μ M de DIM ou 10 nM de TCDD pendant 24h. Les ARN totaux ont par la suite été soumis à des analyses de RT-qPCR.

2.3 Recrutement différentiel de AhR selon le ligand

Après avoir regardé l'induction des gènes cibles de AhR par le DIM et le TCDD et l'effet de l'ajout de l'E2 sur cette induction, nous avons été voir le recrutement de AhR à ces gènes. Au XRE du gène *CYP1A1*, le traitement au DIM et au TCDD induit le recrutement de AhR mais le niveau de recrutement par le DIM est plus faible. A l'ajout de l'E2, une diminution significative du recrutement de AhR par le TCDD est observée ce qui n'est pas le cas pour le recrutement par le DIM. De plus, le niveau de AhR après le traitement avec le TCDD et l'E2 est semblable au niveau de AhR après le traitement avec le DIM (figure 14A). Au XRE du gène *CYP1B1*, le profil de recrutement de AhR est identique à celui du gène *CYP1A1*, mais les niveaux sont plus élevés (figure 14B). On observe un recrutement différentiel de AhR et un effet variable de l'E2 sur ce recrutement selon le ligand.

A



B

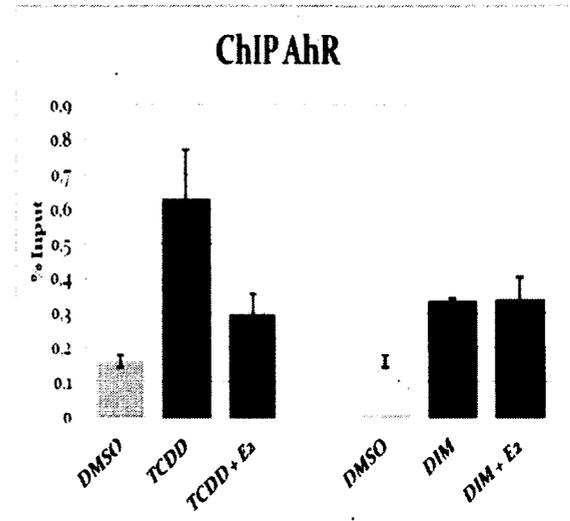
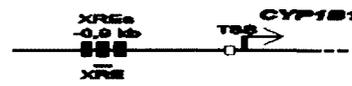


Figure 14: Recrutement de AhR après le traitement au ligand TCDD ou DIM et le co-traitement avec l'E2. A) Recrutement de AhR au XRE de *CYP1A1* B) Au XRE de *CYP1B1*. Les cellules ont été traitées avec 50 μ M de DIM pendant 1 h 00 ou 10 nM de TCDD pendant 1 h 30. Des expériences de ChIP ont par la suite été faites en utilisant l'anticorps anti-AhR. Les ADN ont été analysés par qPCR.

2.4 Effet oestrogène mimétique du DIM

Dans nos expériences, le recrutement de AhR après le traitement avec le TCDD+E2 est au même niveau que le recrutement de AhR suite au traitement avec le DIM seul. Le niveau d'induction du gène *CYP1A1* avec le traitement TCDD+E2 est au même niveau que l'induction du gène par le traitement au DIM seul et l'E2 n'induit pas une répression additionnelle. Nous nous sommes alors demandé si le DIM mimerait les effets de l'E2. Pour vérifier cela, le ICI 182780 (fulvestrant) a été utilisé. Ce dernier est un antagoniste de ER. Il empêche son activation et engendre la dégradation du récepteur. Le ICI 182780 a été utilisé à 100 μ M. Le co-traitement au DIM avec le ICI 182780 augmente l'induction des gènes cibles

de AhR de manière plus accentuée à *CYP1A1* (figure 15A; B; C). Cela montre l'effet œstrogène mimétique du DIM. Ici aussi on voit que le traitement au ICI 182780 n'a pas d'effet significatif dans l'expression du récepteur AhR (figure 15D).

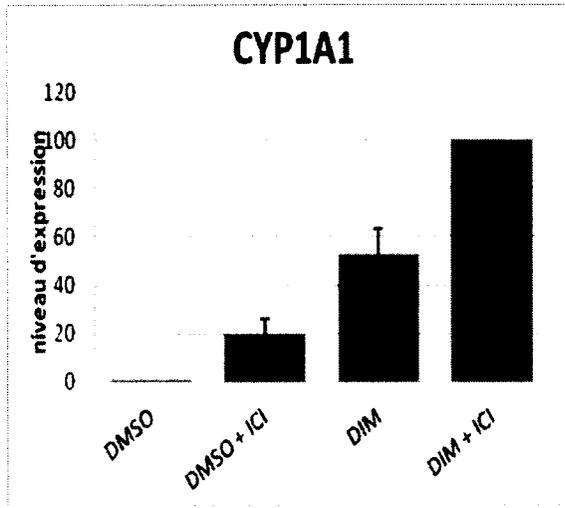
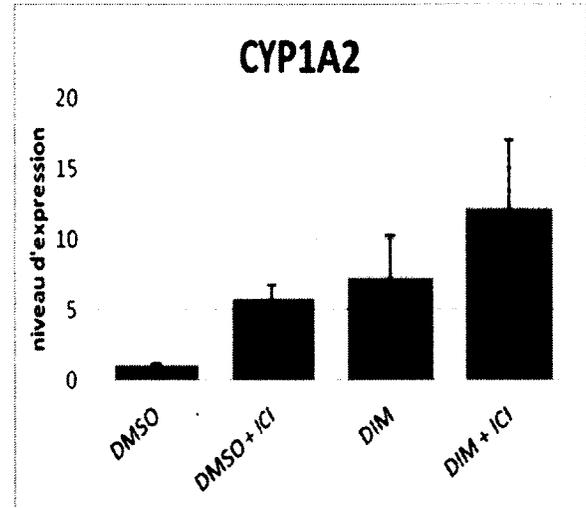
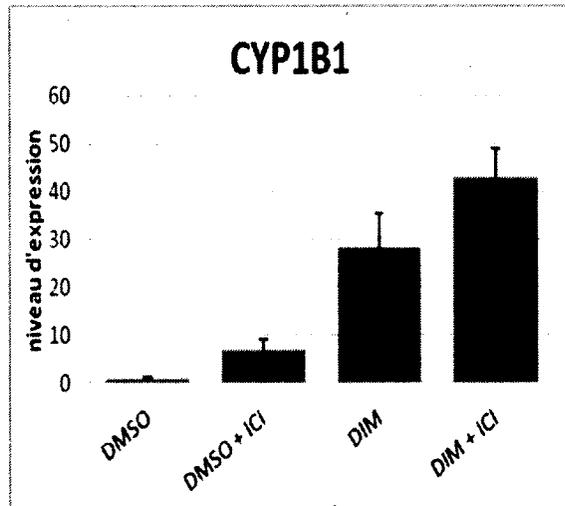
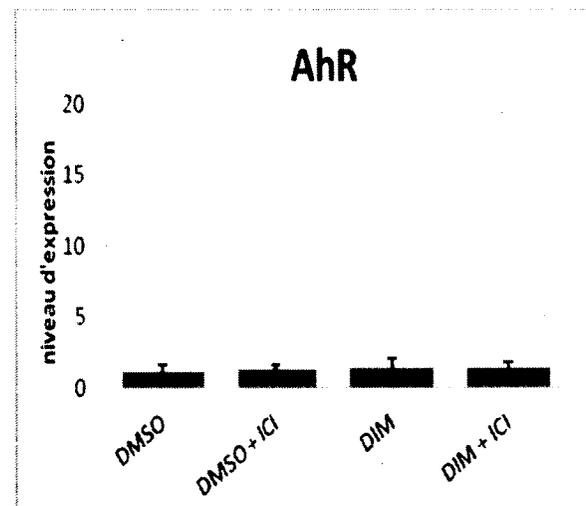
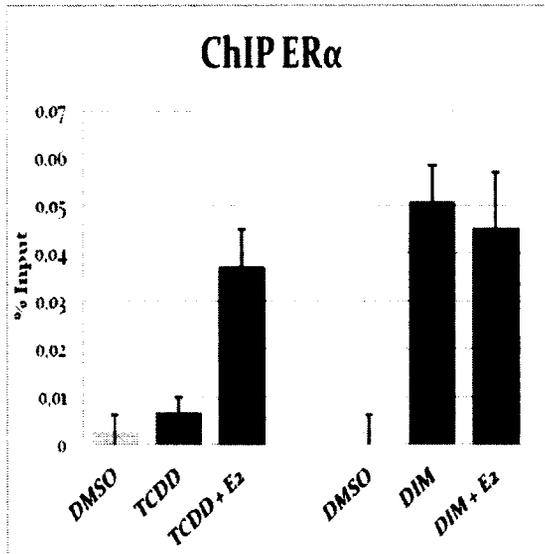
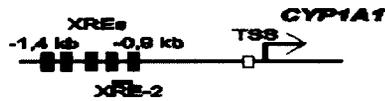
A**C****B****D**

Figure 15: Expression des gènes cibles de AhR après le traitement au DIM et l'ajout du ICI 182780 A) Effet des différents traitements au gène *CYP1A1* B) Au gène *CYP1B1* C) Au gène *CYP1A2* D) Au gène *AhR*. Le ICI 182780 (fulvestrant) est un antagoniste de ER. Les cellules ont été traitées avec 50 μM de DIM ou cotraitées avec 100 μM de ICI 182780 pendant 24h. Les ARN totaux ont par la suite été soumis à des analyses de RT-qPCR.

2.5 Recrutement de ER α suite au traitement à l'E2 ou au DIM

Après la vérification de l'effet œstrogène mimétique du DIM, nous avons comparé le recrutement de ER α aux différents gènes cibles de AhR par les différents ligands à l'étude. Au promoteur du gène *CYP1A1*, on voit que le TCDD induit très faiblement le recrutement de ER α et qu'à l'ajout de l'E2, un grand recrutement de ER α est observé. Le DIM, quant à lui, induit le recrutement de ER α (figure 16A). À l'ajout de l'E2, il n'y a pas de changement significatif de ce recrutement. Au gène *CYP1B1*, le même profil de recrutement de ER α qu'au gène *CYP1A1* est observé avec des niveaux plus élevés, cependant l'ajout de l'E2 suite au traitement avec le DIM induit une petite augmentation du recrutement de ER α (figure 16B). Cela montre l'effet activateur du DIM sur ER α .

A



B

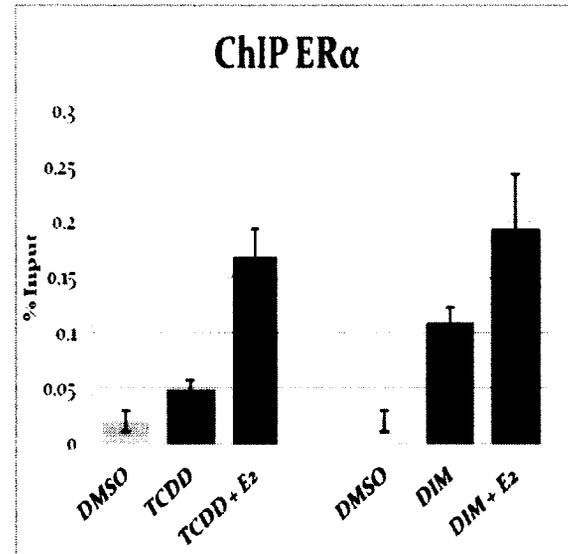
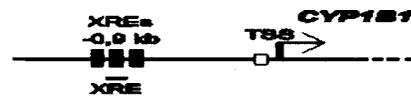


Figure 16: Recrutement de ER α après le traitement au ligand TCDD ou au DIM et le co-traitement avec l'E2. A) Recrutement de ER α au XRE *CYP1A1* B) Au XRE *CYP1B1*. Les cellules ont été traitées avec 50 μ M de DIM pendant 1 h 00 ou 10 nM de TCDD pendant 1 h 30. Des expériences de ChIP ont par la suite été faites en utilisant l'anticorps anti-ER α . Les ADN ont été analysés par qPCR.

2.6 Sédimentation différentielle des complexes protéiques sur un gradient de sucrose

Après la vérification de l'impact de chaque ligand sur les gènes cibles de AhR, une sédimentation différentielle des extraits chromatiniens sur un gradient de sucrose a été réalisée. Le but est de séparer les complexes protéines-ADN selon la taille des complexes protéiques liés à l'ADN puisque la sonication donne environ la même taille d'ADN. Cela permettrait donc d'isoler des promoteurs fonctionnellement distincts (Tanaka et al., 2007). Les cellules ont été traitées comme pour les essais de ChIP. Après la sonication, les extraits

chromatiniens ont été déposés sur des gradients de sucrose. Après la centrifugation et la récupération des fractions, ces dernières ont été analysées par WB pour connaître la distribution des protéines d'intérêt. Les échantillons non pontés ont aussi été utilisés comme contrôle pour vérifier l'éventualité d'une précipitation plutôt qu'une sédimentation différentielle. L'actine est distribuée dans les mêmes fractions que les protéines aient été pontées ou non. Elle se situe dans les fractions de faible densité (Figure 17A). La protéine AhR, quant à elle, a une distribution différente dans les échantillons pontés ou non. AhR se retrouve dans les fractions de faible densité dans les échantillons non pontés. Cette protéine est déplacée vers les fractions de plus haute densité dans les échantillons pontés montrant la présence de cette protéine dans des complexes de plus gros poids moléculaires (figure 17B). Cela montre que le gradient de sucrose sépare différemment les complexes protéiques selon leur taille.

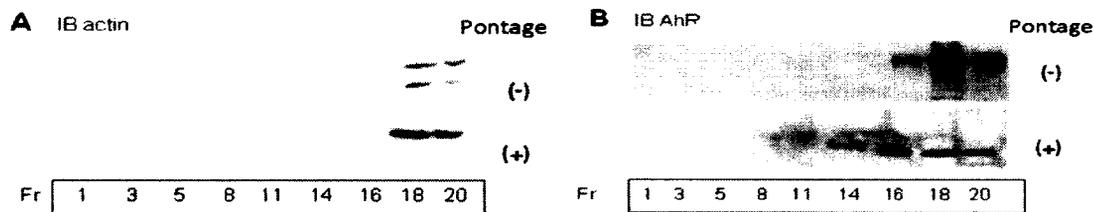
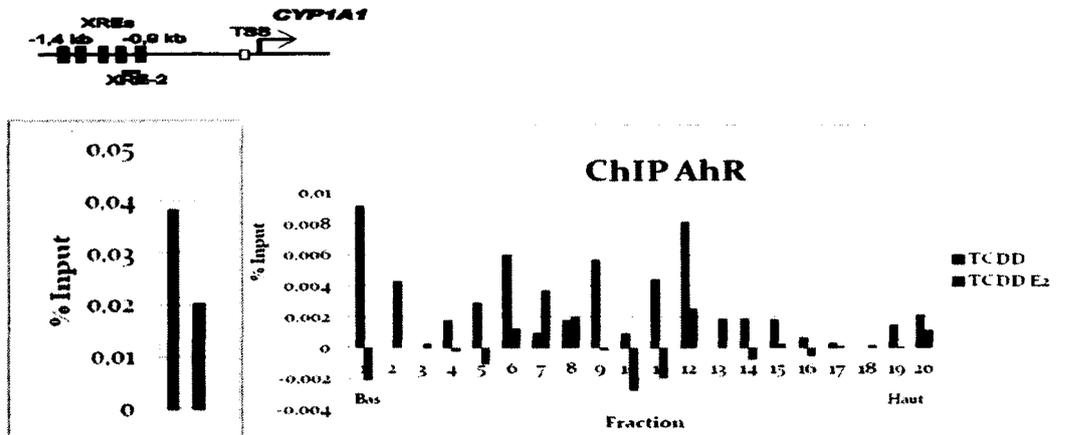


Figure 17: Analyse par immunobuvardage de type Western sur les fractions en utilisant les anticorps contre l'actine et AhR suite au passage des extraits chromatiniens sur un gradient de sucrose. A) Analyse des complexes provenant des échantillons pontés ou non en utilisant l'anticorps contre l'actine B) En utilisant l'anticorps contre AhR. Les cellules ont été traitées avec 10 nM de TCDD. Elles ont par la suite été traitées avec ou sans formaldéhyde (pontage + ou -) avant d'être lysées. Les extraits ont par la suite été soniqués et séparés sur un gradient de sucrose 10-40%. Les fractions collectées ont été analysées par immunobuvardage de type Western.

2.7 Recrutement de AhR et de ER α sur toutes les fractions du gradient de sucrose

Après la vérification de la capacité de séparation du gradient, des CHIP ont été fait sur les fractions pour déterminer celles qui ont le même profil de recrutement des protéines AhR et ER α que les extraits cellulaires non fractionnés. On a vu que les fractions 5 et 12 ont le même profil de recrutement de ces protéines que les extraits cellulaires non fractionnés (à gauche) c'est-à-dire un recrutement de AhR au promoteur du gène *CYP1A1* suite au traitement avec le TCDD et une diminution de ce recrutement à l'ajout de l'E2 (figure 18A). Pour ce qui est de ER α , on a juste un recrutement de cette protéine au XRE du gène *CYP1A1* suite au traitement des cellules au TCDD et à l'E2. (Figure 18B).

A



B

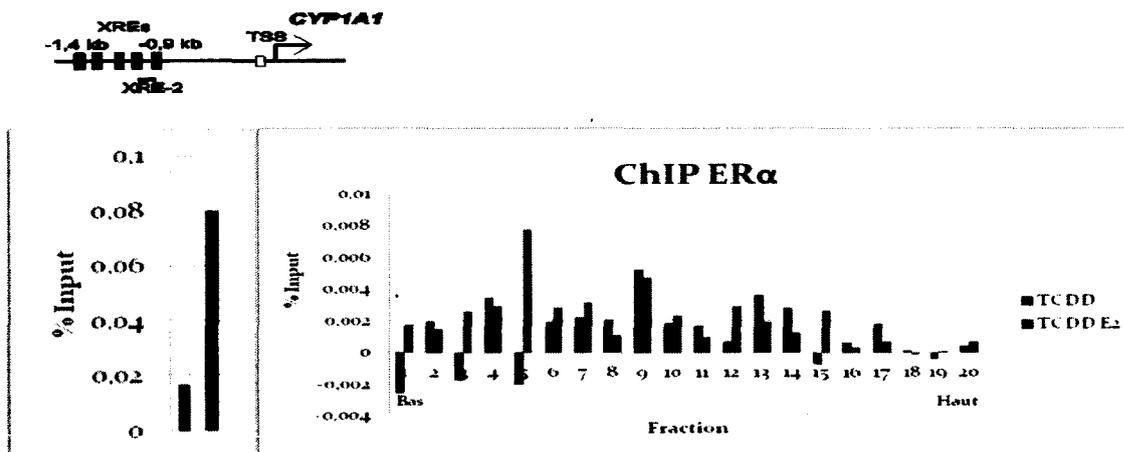


Figure 18: Recrutement de AhR et de ERα suite au traitement au TCDD et TCDD+E2 dans différentes fractions. A) Recrutement de AhR au XRE du gène *CYP1A1* B) Recrutement de ERα au XRE du gène *CYP1A1*. Des expériences de ChIP ont été faites sur les fractions et analysées par qPCR pour déterminer le profil de recrutement protéique en comparaison avec les extraits cellulaires non fractionnés (à gauche).

CHAPITRE III: DISCUSSION

Les humains sont exposés à des ligands de AhR par la pollution et par l'alimentation. Nous avons voulu voir l'effet de deux ligands, TCDD (néfaste) et DIM (bénéfique), sur les gènes cibles de AhR. Des expériences ont montré, notamment dans le laboratoire, une répression différentielle des gènes cibles de AhR par ER α suite au traitement avec le TCDD (Angus et al., 1999; Beischlag and Perdew, 2005; Coumoul et al., 2001; Kharat and Saatcioglu, 1996; Ricci et al., 1999). Nous avons donc voulu voir si un traitement au DIM donne les mêmes effets. Le DIM est un ligand bénéfique pour plusieurs cancers (Chen et al., 1998; Kirsh et al., 2007; Terry et al., 2001). Un traitement au TCDD induit plus fortement le gène *CYP1A1* qu'un traitement au DIM. À l'ajout de l'E2 (ligand de ER α) on a une répression du gène *CYP1A1* après l'induction au TCDD mais aucune répression n'est observée après l'induction au DIM (figure 13A). Cela est surprenant, car on s'attendait à obtenir l'effet répresseur de ER α à ce gène. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le DIM est un ligand moins fort de AhR d'où le niveau d'induction moins élevé que celui du TCDD (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003). La non-répression par l'E2 après le traitement au DIM pourrait s'expliquer par le fait que AhR, activé par le DIM, n'induit pas le recrutement de ER α ou que le DIM mime les effets de l'E2. Une autre explication serait que les deux protéines soient recrutées, mais qu'il y ait un recrutement des co-régulateurs différents à ces gènes induits par différents ligands. De plus, *CYP1B1* est induit de manière égale par les deux ligands et l'ajout de l'E2 n'a aucun effet sur cette induction (Figure 13B). L'E2 n'exerce pas d'effet répresseur à ce gène. Ici aussi cela pourrait être dû au non-recrutement de ER α ou à l'effet des co-régulateurs. Le traitement au DIM n'induit pas le gène *CYP1A2* alors que celui au TCDD induit le gène. L'ajout de l'E2 induit une répression du gène après l'induction au TCDD (Figure 13C). Cela est aussi surprenant, car nous nous attendions à ce que le profil d'induction des gènes *CYP1A1* et *CYP1A2* soit le même que celui observé pour le ligand TCDD. La non-induction de *CYP1A2* par le DIM pourrait s'expliquer par le fait que ce dernier induit le recrutement de répresseurs ou de co-répresseurs à ce gène ce qui inhibe son expression. Après avoir regardé

l'induction des gènes cibles de AhR par ses ligands et l'effet de l'ajout de l'E2 sur cette induction, nous avons été voir le recrutement de AhR à ces gènes. Au XRE du gène *CYP1A1*, le traitement au DIM et au TCDD induit le recrutement de AhR mais le niveau de recrutement par le DIM est plus faible. A l'ajout de l'E2, une diminution significative du recrutement de AhR par le TCDD est observée ce qui n'est pas le cas pour le recrutement par le DIM (figure 14A). Les effets sur le recrutement de AhR à ce gène suivent le même profil que l'induction du gène. De plus, le niveau de AhR après le traitement avec le TCDD et l'E2 est semblable au niveau de AhR après le traitement avec le DIM (figure 14A). Cela suggère que le DIM pourrait mimer les effets de l'E2 en activant ER α . Pour vérifier cette hypothèse, le ICI 182780 (fulvestrant), un antagoniste de ER a été utilisé (Howell et al., 2000). Le co-traitement au DIM avec le ICI 182780 augmente l'induction des gènes cibles de AhR de manière plus accentuée à *CYP1A1* (figure 15A; B; C). Cela confirme l'effet œstrogène mimétique *ex vivo* du DIM. De plus, une étude a montré *in vitro* que le DIM peut activer ER α de manière ligand indépendante (Riby et al., 2000). Au XRE du gène *CYP1B1*, le profil de recrutement de AhR est identique à celui du gène *CYP1A1*, mais les niveaux sont plus élevés (figure 14B). Cela ne suit pas le même profil que l'induction du gène, ce qui pourrait être dû à l'effet des co-régulateurs. De plus, la comparaison des niveaux de recrutement de AhR par le TCDD et le DIM ne suivent pas les niveaux d'induction du gène. Ici aussi cela pourrait être dû à l'effet des co-régulateurs.

Puisque le DIM a un effet oestrogène mimétique, il doit induire le recrutement de ER α . Au promoteur du gène *CYP1A1*, on voit que le TCDD induit très faiblement le recrutement de ER α et qu'à l'ajout de l'E2, un grand recrutement de ER α est observé. La diminution de l'induction du gène *CYP1A1* par l'E2 suite au traitement avec le TCDD qu'on avait observé peut être due à une compétition de AhR et ER α pour les corégulateurs ou à une inhibition directe de l'effet activateur le AhR par ER α (Beischlag and Perdew, 2005; Matthews et al., 2005). Le DIM, quant à lui, induit le recrutement de ER α ce à quoi nous nous étions attendus (figure 16A). À l'ajout de l'E2, il n'y a pas de changement significatif de ce recrutement, ce qui indique que le DIM induit au maximum le recrutement de ER α . Cela pourrait expliquer le fait qu'il n'y a pas eu de répression du gène *CYP1A1* à l'ajout de l'E2 suite au traitement avec le DIM. Au gène *CYP1B1*, le même profil de recrutement de ER α qu'au gène *CYP1A1* est

observé avec des niveaux plus élevés, cependant l'ajout de l'E2 suite au traitement avec le DIM induit une petite augmentation du recrutement de ER α (figure 16B). Cela pourrait être dû au fait que le gène *CYP1B1* possède un élément de liaison à ER α (ERE) (Tsuchiya et al., 2004). En effet, si le XRE est proche du ERE, il pourrait y avoir des protéines (ER α) liées à ce dernier qui sont pontées avec celles liées au XRE.

Après la vérification de l'impact de chaque ligand sur les gènes cibles de AhR, une sédimentation différentielle des extraits chromatiniens sur un gradient de sucrose a été réalisée. Le but est de séparer les complexes protéines-ADN selon la taille des complexes protéiques liés à l'ADN puisque la sonication donne environ la même taille d'ADN. Cela permettrait donc d'isoler des promoteurs fonctionnellement distincts (Tanaka et al., 2007). Les échantillons non pontés ont aussi été utilisés comme contrôle pour vérifier l'éventualité d'une précipitation plutôt qu'une sédimentation différentielle. Dans ces échantillons non pontés, des protéines libres devraient être retrouvées dans les dernières fractions, c'est-à-dire les fractions à faible densité. L'actine est distribuée dans les mêmes fractions que les protéines aient été pontées ou non. Elle se situe dans les fractions de faible densité (Figure 17A). Ce résultat était attendu, car seule une faible quantité d'actine se retrouve en complexe avec l'ADN. La majorité de l'actine se retrouve non liée à l'ADN dans les cellules. La protéine AhR, quant à elle, a une distribution différente dans les échantillons pontés ou non. AhR se retrouve dans les fractions de faible densité dans les échantillons non pontés comme attendu. Cette protéine est déplacée vers les fractions de plus haute densité dans les échantillons pontés montrant la présence de cette protéine dans des complexes de plus gros poids moléculaires (figure 17B). Cela montre que le gradient permet une séparation différentielle des complexes. Il est cependant à noter que le gradient peut être perturbé lors des manipulations (transport à l'ultracentrifugeuse, perçage du tube...) induisant une diminution de la précision de la séparation des complexes protéiques.

Après la vérification de la capacité de séparation du gradient, des CHIP ont été faits sur les fractions pour déterminer celles qui ont le même profil de recrutement des protéines AhR et ER α que les extraits cellulaires non fractionnés. On a vu que les fractions 5 et 12 ont le même

profil de recrutement de ces protéines que les extraits cellulaires non fractionnés c'est-à-dire un recrutement de AhR au promoteur du gène *CYP1A1* suite au traitement avec le TCDD et une diminution de ce recrutement à l'ajout de l'E2 (figure 18A). Pour ce qui est de ER α , on a juste un recrutement de cette protéine au XRE du gène *CYP1A1* suite au traitement des cellules au TCDD et à l'E2. (Figure 18B). Des fractions 5 et 12 isolées de plusieurs gradients de sucrose seront respectivement combinées afin d'immunoprécipiter de plus grandes quantités de ER α ou de AhR. Les protéines contenues dans ces immunoprécipitats seront par la suite analysées en spectrométrie de masse. Ces protéines sont potentiellement des co-régulateurs impliqués dans la réponse transcriptionnelle induite par les récepteurs AhR et ER α . L'identification des co-régulateurs permettrait de mieux connaître les mécanismes par lesquels la régulation différentielle des gènes cibles de AhR par ER α se fait. De plus, ces co-régulateurs seront potentiellement des cibles thérapeutiques car, pour ce qui concerne le TCDD, leur inhibition permettrait le rétablissement du ratio *CYP1A1/CYP1B1* dans la cellule.

CONCLUSION

Les résultats obtenus lors des recherches effectuées dans le cadre de mon projet de maîtrise ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires d'action des différents ligands de AhR sur ses gènes cibles ainsi que l'effet de l'E2 sur ces gènes. Pour le ligand toxique et cancérigène, le TCDD, une répression du gène *CYP1A1* par l'ajout de l'E2 est observée alors que le gène *CYP1B1* n'est pas affecté. Ceci diminue le ratio *CYP1A1/CYP1B1* qui est un indicateur de risque pour le cancer (Coumoul et al., 2001). En effet, *CYP1A1* métabolise l'œstrogène en 2-OHE2 qui est bénéfique alors que *CYP1B1* métabolise cette hormone en 4-OHE2 qui est un produit potentiellement cancérigène. La répression du gène *CYP1A1* est corrélée positivement avec une diminution du recrutement de la protéine AhR et une augmentation du recrutement de la protéine ER α . Ce dernier récepteur médie l'effet répresseur de l'E2. Le gène *CYP1B1* est induit différemment, cependant, le même profil de recrutement protéique est observé (Marques et al, en préparation). Cela est expliqué par le recrutement de co-régulateurs différents à ces gènes. Pour l'identification des co-régulateurs, des fractions d'intérêt ont été sélectionnées par des essais de CHIP en utilisant des anticorps contre AhR et ER α . Ces fractions ont le même profil de recrutement protéique que les extraits cellulaires non fractionnés provenant de cellules traitées au TCDD ou au TCDD+E2. Il faudrait, à ce point, mettre en commun plus de fractions afin d'avoir assez de matériel pour l'analyse subséquente en spectrométrie de masse.

Le DIM a été montré comme exerçant son effet anticancérigène, entre autres, par l'activation de p21 et l'induction de l'IFN γ (Gong et al., 2006; Riby et al., 2000). Cette étude met en évidence une autre voie pour l'effet anticancérigène du DIM. Cette voie consiste au maintien du ratio *CYP1A1/CYP1B1* dans la cellule. De plus, l'ajout de l'E2 suite au traitement avec le DIM n'a aucun effet sur les deux gènes. L'effet œstrogène mimétique, *ex vivo*, du DIM a été démontré. Une étude avait suggéré que le DIM active ER *in vitro* (Riby et al., 2000). Le DIM a un effet moindre sur l'induction des gènes cibles de AhR par rapport au TCDD car il active

en même temps AhR et ER α . Il médie donc à la fois l'effet activateur et répresseur respectif des facteurs sur les gènes cibles de AhR. En effet, avec le DIM, un recrutement maximal de ER α aux gènes est observé et l'ajout de l'E2 n'a pas d'effet additionnel sur ce recrutement. À ce point, il faudrait identifier des fractions ayant le même profil de recrutement protéique que les extraits cellulaires non fractionnés suite au traitement avec le DIM ou avec le DIM+E2 comme cela a été fait pour le TCDD. Ensuite, Il faudrait faire des IP sur ces fractions afin d'identifier des co-régulateurs potentiels en spectrométrie de masse. Le modèle d'induction des gènes cibles de AhR suite au traitement avec le DIM ou le TCDD et l'effet de l'E2 sur ces gènes est résumé à la figure 19.

AhR forme un dimère avec Arnt pour activer ses gènes cibles (Reyes et al., 1992). Nos résultats nous permettent de dire qu'un traitement au TCDD induit un recrutement de AhR-Arnt lié au ligand et l'activation des gènes cibles de AhR. À l'ajout le l'E2, un recrutement de ER α lié au ligand est observé ainsi qu'une inhibition du gène *CYP1A1*, mais pas de *CYP1B1* (Figure 19A). Le traitement au DIM induit le recrutement de AhR-Arnt lié au ligand et un recrutement de ER α non lié au ligand qui pourrait être activé par des modifications post-traductionnelles. Cela a pour effet une activation du gène, mais à un niveau moindre que celui du TCDD dû au potentiel répresseur de ER α . À l'ajout de l'E2, aucun recrutement additionnel de ER α n'est observé et l'induction des deux gènes reste inchangée (Figure 19B).

En perspective, après avoir identifié des co-régulateurs, il serait intéressant de voir l'effet de leur déplétion sur l'induction des gènes CYP ainsi que sur le recrutement des protéines AhR et ER α . Cela permettrait de mieux connaître la régulation des gènes cibles de AhR et les mécanismes moléculaires des interactions croisées entre les deux récepteurs. Il serait aussi très intéressant d'approfondir l'étude en regardant les modifications post traductionnelles des histones contenues dans les gènes cibles de AhR suite aux différents traitements. De plus, on pourrait regarder tous ces effets sur certains gènes cibles de ER α comme pS2 pour connaître l'effet des co-régulateurs potentiels ces gènes.

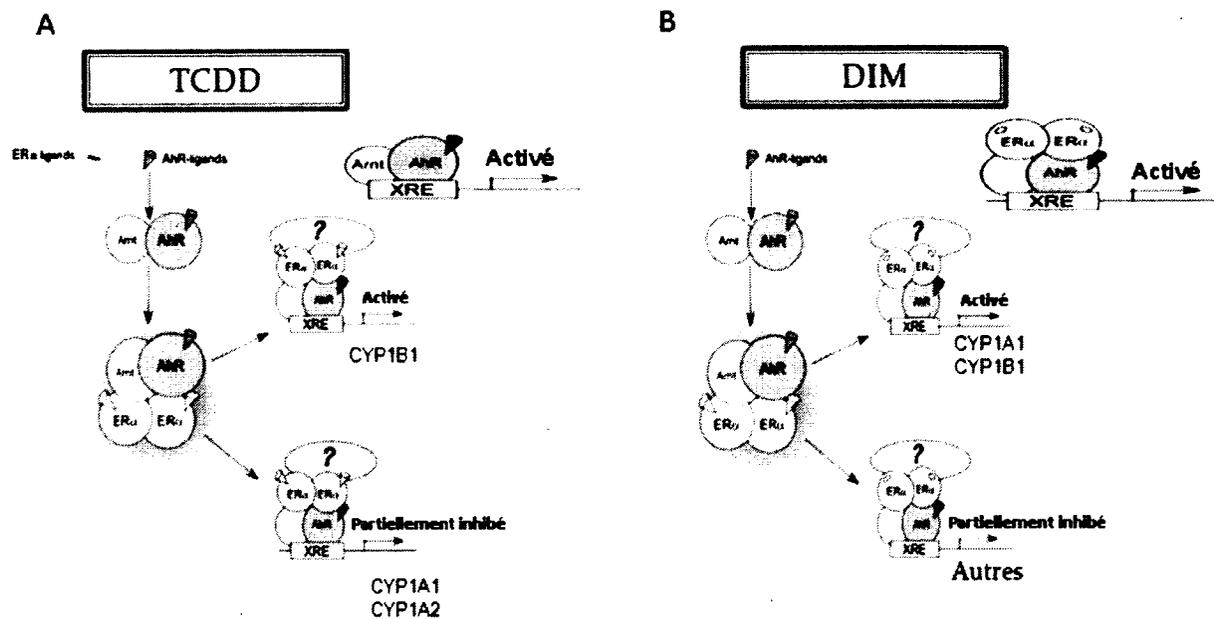


Figure 19: Recrutement de AhR et ERα et induction différentielle des gènes cibles de AhR (Adaptaté de (Ohtake et al., 2009)). A) Après le traitement avec le TCDD et l'E2 B) Après le traitement avec le DIM et l'E2

BIBLIOGRAPHIE

Allfrey, V.G., Inoue, A., Karn, J., Johnson, E.M., and Vidali, G. (1974). Phosphorylation of DNA-binding nuclear acidic proteins and gene activation in the HeLa cell cycle. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 38, 785-801.

Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A., and Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9990-9995.

Angus, W.G.R., Larsen, M.C., and Jefcoate, C.R. (1999). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: Role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis* 20, 947-955.

Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.-., Sauter, G., Kallioniemi, O.-., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.

Ascenzi, P., Bocedi, A., and Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Mol. Aspects Med.* 27, 299-402.

Baccarelli, A., Pesatori, A.C., Consonni, D., Mocarelli, P., Patterson Jr., D.G., Caporaso, N.E., Bertazzi, P.A., and Landi, M.T. (2005). Health status and plasma dioxin levels in chloracne cases 20 years after the Seveso, Italy accident. *Br. J. Dermatol.* 152, 459-465.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Barnes-Ellerbe, S., Knudsen, K.E., and Puga, A. (2004). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin blocks androgen-dependent cell proliferation of LNCaP cells through modulation of pRB phosphorylation. *Mol. Pharmacol.* 66, 502-511.

Beato, M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56, 335-344.

Beato, M., and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: An update. *Hum. Reprod. Update* 6, 225-236.

Beischlag, T.V., Morales, J.L., Hollingshead, B.D., and Perdew, G.H. (2008). The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *18*, 207-250.

Beischlag, T.V., and Perdew, G.H. (2005). ER α -AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J. Biol. Chem.* *280*, 21607-21611.

Beischlag, T.V., Taylor, R.T., Rose, D.W., Yoon, D., Chen, Y., Lee, W.-., Rosenfeld, M.G., and Hankinson, O. (2004). Recruitment of thyroid hormone receptor/retinoblastoma-interacting protein 230 by the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator is required for the transcriptional response to both dioxin and hypoxia. *J. Biol. Chem.* *279*, 54620-54628.

Beischlag, T.V., Wang, S., Rose, D.W., Torchia, J., Reisz-Porszasz, S., Muhammad, K., Nelson, W.E., Probst, M.R., Rosenfeld, M.G., and Hankinson, O. (2002). Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4319-4333.

Belandia, B., Orford, R.L., Hurst, H.C., and Parker, M.G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J.* *21*, 4094-4103.

Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* *447*, 407-412.

Bertazzi, P.A., Consonni, D., Bachetti, S., Rubagotti, M., Baccarelli, A., Zocchetti, C., and Pesatori, A.C. (2001). Health effects of dioxin exposure: A 20-year mortality study. *Am. J. Epidemiol.* *153*, 1031-1044.

Blackwood, E.M., and Kadonaga, J.T. (1998). Going the distance: A current view of enhancer action. *Science* *281*, 60-63.

Blazek, E., Mittler, G., and Meisterernst, M. (2005). The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* *113*, 399-408.

Bottomley, M.J. (2004). Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Rep.* *5*, 464-469.

Bradbury, E.M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* *14*, 9-16.

Breen, A.P., and Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine* *18*, 1033-1077.

Brehm, A., Tufteland, K.R., Aasland, R., and Becker, P.B. (2004). The many colours of chromodomains. *Bioessays* 26, 133-140.

Brown, N.M., Manzillo, P.A., Zhang, J.-., Wang, J., and Lamartiniere, C.A. (1998). Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat. *Carcinogenesis* 19, 1623-1629.

Brunnberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A., and Pongratz, I. (2003). The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 6517-6522.

Camerini Otero, R.D., Sollner Webb, B., and Felsenfeld, G. (1976). The organization of histones and DNA in chromatin: evidence for an arginine rich histone kernel. *Cell* 8, 333-347.

Cariou, S., Donovan, J.C.H., Flanagan, W.M., Milic, A., Bhattacharya, N., and Slingerland, J.M. (2000). Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27KIP1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 9042-9046.

Carlson, D.B., and Perdew, G.H. (2002). A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 317-325.

Cavalieri, E.L., and Rogan, E.G. (2004). A unifying mechanism in the initiation of cancer and other diseases by catechol quinones. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1028, 247-257.

Cavalieri, E.L., Stack, D.E., Devanesan, P.D., Todorovic, R., Dwivedy, I., Higginbotham, S., Johansson, S.L., Patil, K.D., Gross, M.L., Gooden, J.K., *et al.* (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10937-10942.

Cavalieri, E.L., Vauthier, E.C., Cossé-Barbi, A., and Fliszár, S. (2000). The glycosyl C1'-N9 bond of deoxyadenosine and deoxyguanosine: Response to electrophilic attacks on the purinic nitrogen atoms. *Theoretical Chemistry Accounts* 104, 235-239.

Chadick, J.Z., and Asturias, F.J. (2005). Structure of eukaryotic Mediator complexes. *Trends Biochem. Sci.* 30, 264-271.

Chang, X., Tou, J.C., Hong, C., Kim, H.A., Riby, J.E., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2005). 3,3'-Diindolylmethane inhibits angiogenesis and the growth of transplantable human breast carcinoma in athymic mice. *Carcinogenesis* 26, 771-778.

Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone

acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

Chen, H.-., Lee, C.-., Liao, P.-., Guo, Y.-., Chen, C.-., and Su, H.-. (2003). Associations between dietary intake and serum polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran (PCDD/F) levels in Taiwanese. *Environ. Res.* 91, 172-178.

Chen, I., McDougal, A., Wang, F., and Safe, S. (1998). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane. *Carcinogenesis* 19, 1631-1639.

Chen, Z.-., Hurh, Y.-., Na, H.-., Kim, J.-., Chun, Y.-., Kim, D.-., Kang, K.-., Cho, M.-., and Surh, Y.-. (2004). Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 25, 2005-2013.

Cheung, P., Tanner, K.G., Cheung, W.L., Sassone-Corsi, P., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell* 5, 905-915.

Choi, H.J., Lim, D.Y., and Park, J.H.Y. (2009). Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells. *BMC Gastroenterology* 9,

Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H.J., and Vermeulen, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7643-7653.

Claessens, F., and Gewirth, D.T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem.* 40, 59-72.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* 78, 273-304.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 250-255.

Corchero, J., Pimprale, S., Kimura, S., and Gonzalez, F.J. (2001). Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: Implications for gene regulation. *Pharmacogenetics* 11, 1-6.

Côté, J., Utley, R.T., and Workman, J.L. (1995). [6] Basic analysis of transcription factor binding to nucleosomes. *Methods in Molecular Genetics* 6, 108-128.

Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., and Barouki, R. (2001). Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res.* 61, 3942-3948.

Couse, J.F., and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20, 358-417.

Crawford, A.C., Riggins, R.B., Shajahan, A.N., Zwart, A., and Clarke, R. (2010). Co-inhibition of BCL-W and BCL2 restores antiestrogen sensitivity through BECN1 and promotes an autophagy-associated necrosis. *PLoS ONE* 5,

Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S.A., Jordan, V.C., Katzenellenbogen, J.A., Korach, K.S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M.G., and Gustafsson, J.-. (2006). International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 773-781.

Dalessandri, K.M., Firestone, G.L., Fitch, M.D., Bradlow, H.L., and Bjeldanes, L.F. (2004). Pilot study: effect of 3,3'-diindolylmethane supplements on urinary hormone metabolites in postmenopausal women with a history of early-stage breast cancer. *Nutr. Cancer* 50, 161-167.

Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.J. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol. Cell* 10, 409-415.

De Cesare, D., Jacquot, S., Hanauer, A., and Sassone-Corsi, P. (1998). Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of *c-fos* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 12202-12207.

De Kruif, C.A., Marsman, J.W., Venekamp, J.C., Falke, H.E., Noordhoek, J., Blaauboer, B.J., and Wortelboer, H.M. (1991). Structure elucidation of acid reaction products of indole-3-carbinol: Detection in vivo and enzyme induction in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 80, 303-315.

Demarest, S.J., Martinez-Yamout, M., Chung, J., Chen, H., Xu, W., Jane Dyson, H., Evans, R.M., and Wright, P.E. (2002). Mutual synergistic folding in recruitment of CBP/p300 by p160 nuclear receptor coactivators. *Nature* 415, 549-553.

Dickson, R.B., and Lippman, M.E. (1995). Growth factors in breast cancer. *Endocr. Rev.* 16, 559-589.

Doisneau-Sixou, S.F., Sergio, C.M., Carroll, J.S., Hui, R., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (2003). Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 10, 179-186.

Domingo, J.L., Agramunt, M.C., Nadal, M., Schuhmacher, M., and Corbella, J. (2002). Health risk assessment of PCDD/PCDF exposure for the population living in the vicinity of a municipal waste incinerator. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 461-465.

Dragan, Y.P., and Schrenk, D. (2000). Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. *Food Addit. Contam.* 17, 289-302.

Duan, R., Porter, W., Samudio, I., Vyhldal, C., Kladdé, M., and Safe, S. (1999). Transcriptional activation of c-fos protooncogene by 17 β -Estradiol: Mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Molecular Endocrinology* 13, 1511-1521.

Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G., and G elinas, C. (2006). Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene* 25, 6800-6816.

Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C., and Clayton, A.L. (2008). Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J.* 27, 406-420.

Enmark, E., Peltto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskj old, M., and Gustafsson, J.-. (1997). Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258-4265.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-453.

Fenton, S.E., Hamm, J.T., Birnbaum, L.S., and Youngblood, G.L. (2002). Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicological Sciences* 67, 63-74.

Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S.T., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the Dioxin-Binding Ah receptor. *Science* 268, 722-726.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425, 475-479.

Fisher, B., Costantino, J.P., Wickerham, D.L., Cecchini, R.S., Cronin, W.M., Robidoux, A., Bevers, T.B., Kavanah, M.T., Atkins, J.N., Margolese, R.G., *et al.* (2005). Tamoxifen for the prevention of breast cancer: Current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.* *97*, 1652-1662.

Foster, J.S., Henley, D.C., Ahamed, S., and Wimalasena, J. (2001). Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends in Endocrinology and Metabolism* *12*, 320-327.

Foster, J.S., and Wimalasena, J. (1996). Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* *10*, 488-498.

Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M.S., Adlercreutz, H., Montesano, R., Nawroth, P.P., and Schweigerer, L. (1994). The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* *368*, 237-239.

Fraser, R.A., Heard, D.J., Adam, S., Lavigne, A.C., Le Douarin, B., Tora, L., Losson, R., Rochette-Egly, C., and Chambon, P. (1998). The putative cofactor TIF1 α is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* *273*, 16199-16204.

Fujii-Kuriyama, Y., and Mimura, J. (2005). Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 311-317.

Georges, A.B., Benayoun, B.A., Caburet, S., and Veitia, R.A. (2010). Generic binding sites, generic DNA-binding domains: Where does specific promoter recognition come from? *FASEB Journal* *24*, 346-356.

Gierthy, J.F., and Lincoln II, D.W. (1988). Inhibition of postconfluent focus production in cultures of MCF-7 human breast cancer cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Breast Cancer Res. Treat.* *12*, 227-233.

Gierthy, J.F., Lincoln, D.W., Gillespie, M.B., Seeger, J.I., Martinez, H.L., Dickerman, H.W., and Kumar, S.A. (1987). Suppression of estrogen -regulated extracellular tissue plasminogen activator activity of MCF-7 cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* *47*, 6198-6203.

Gillesby, B.E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z.F., and Zacharewski, T.R. (1997). Identification of a motif within the 5' regulatory region of pS2 which is responsible for AP-1 binding and TCDD-mediated suppression. *Biochemistry (N. Y.)* *36*, 6080-6089.

Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Development* *14*, 121-141.

- Gong, Y., Sohn, H., Xue, L., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2006). 3,3'-Diindolylmethane is a novel mitochondrial H⁺-ATP synthase inhibitor that can induce p21Cip1/Waf1 expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. *Cancer Res.* *66*, 4880-4887.
- Gosden, J.R., Middleton, P.G., and Rout, D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24→q27 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* *43*, 218-220.
- Göttlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *Journal of Molecular Medicine* *76*, 480-489.
- Grant, P.A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol.* *2*,
- Grant, P.A., and Berger, S.L. (1999). Histone acetyltransferase complexes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* *10*, 169-177.
- Gu, W., and Roeder, R.G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* *90*, 595-606.
- Guschin, D., and Wolffe, A.P. (1999). Transcriptional control: SWItched-on mobility. *Current Biology* *9*, R742-R746.
- Hahn, M.E. (2002). Aryl hydrocarbon receptors: Diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* *141*, 131-160.
- Hall, J.M., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* *276*, 36869-36872.
- Hankinson, O. (2005). Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* *433*, 379-386.
- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *35*, 307-340.
- Hansen, J.C., Tse, C., and Wolffe, A.P. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: More than meets the eye. *Biochemistry (N. Y.)* *37*, 17637-17641.
- Harper, N., Wang, X., Liu, H., and Safe, S. (1994). Inhibition of estrogen-induced progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells by aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* *104*, 47-55.
- Harris, H.A. (2007). Estrogen receptor-β: Recent lessons from in vivo studies. *Molecular Endocrinology* *21*, 1-13.

- Hasler, J.A. (1999). Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol. Aspects Med.* 20, 12-24, 25-24137.
- Hassoun, E.A., Vodhanel, J., and Abushaban, A. (2004). The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 196-203.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387, 733-736.
- Henderson, B.E., Ross, R., and Bernstein, L. (1988). Estrogens as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal foundation award lecture. *Cancer Res.* 48, 246-253.
- Hengartner, C.J., Myer, V.E., Liao, S.-., Wilson, C.J., Koh, S.S., and Young, R.A. (1998). Temporal regulation of RNA polymerase II by Srb10 and Kin28 cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell* 2, 43-53.
- Hernandez, S., Watson, R.W.G., Wood, T.C., and Weinshilboum, R.M. (1992). Sulfation of estrone and 17 β -estradiol in human liver: Catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Drug Metab. Disposition* 20, 413-422.
- Hestermann, E.V., and Brown, M. (2003). Agonist and Chemopreventative Ligands Induce Differential Transcriptional Cofactor Recruitment by Aryl Hydrocarbon Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7920-7925.
- Hochheimer, A., and Tjian, R. (2003). Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. *Genes and Development* 17, 1309-1320.
- Hong, C., Kim, H.-., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2002). 3,3'-Diindolymethane (DIM) induces a G1 cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21 WAF1/CIP1 expression. *Carcinogenesis* 23, 1297-1305.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J., and Stallcup, M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2735-2744.
- Horn, P.J., and Peterson, C.L. (2002). Molecular biology: Chromatin higher order folding: Wrapping up transcription. *Science* 297, 1824-1827.
- Howell, A., Osborne, C.K., Morris, C., and Wakeling, A.E. (2000). ICI 182,780 (Faslodex(TM)): Development of a novel, 'pure' antiestrogen. *Cancer* 89, 817-825.

- Iannuzzi, L., Perucatti, A., Di Meo, G.P., Polimeno, F., Ciotola, F., Incarnato, D., Peretti, V., Caputi-Jambrenghi, A., Pecoraro, A., Manniti, F., Alessandro, A.D., and Vonghia, G. (2004). Chromosome fragility in two sheep flocks exposed to dioxins during pasturage. *Mutagenesis* *19*, 355-359.
- IARC. (1999). IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to human. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans *74*, 9-31.
- IARC. (1997). IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. *69*, 1-631.
- IARC. (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Supplement / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer *7*, 1-440.
- Imbalzano, A.N., Kwon, H., Green, M.R., and Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* *370*, 481-485.
- Ito, T. (2007). Role of histone modification in chromatin dynamics. *J. Biochem.* *141*, 609-614.
- Jellinck, P.H., Forkert, P.G., Riddick, D.S., Okey, A.B., Michnovicz, J.J., and Bradlow, H.L. (1993). Ah receptor binding properties of indole carbinols and induction of hepatic estradiol hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* *45*, 1129-1136.
- Jepsen, K., and Rosenfeld, M.G. (2002). Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes. *J. Cell. Sci.* *115*, 689-698.
- Johnson, E.F. (1991). A partnership between the dioxin receptor and a basic helix-loop-helix protein. *Science* *252*, 924-925.
- Ju, B.-., Luniak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* *312*, 1798-1802.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.-., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* *85*, 403-414.
- Kandala, P.K., and Srivastava, S.K. (2010). Activation of checkpoint kinase 2 by 3,3'-diindolylmethane is required for causing G2/M cell cycle arrest in human ovarian cancer cells. *Mol. Pharmacol.* *78*, 297-309.

Kang, H.J., Kim, H.J., Kim, S.K., Barouki, R., Cho, C.-., Khanna, K.K., Rosen, E.M., and Bae, I. (2006). BRCA1 modulates xenobiotic stress-inducible gene expression by interacting with ARNT in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 14654-14662.

Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2001). The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2594-2607.

Keeton, E.K., and Brown, M. (2005). Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor- α and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. *Molecular Endocrinology* *19*, 1543-1554.

Kerppola, T.K., and Curran, T. (1997). The transcription activation domains of Fos and Jun induce DNA bending through electrostatic interactions. *EMBO J.* *16*, 2907-2916.

Kershner, E., Wu, S.-., and Chiang, C.-. (1998). Immunoaffinity purification and functional characterization of human transcription factor IIH and RNA polymerase II from clonal cell lines that conditionally express epitope-tagged subunits of the multiprotein complexes. *J. Biol. Chem.* *273*, 34444-34453.

Kharat, I., and Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor: Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* *271*, 10533-10537.

Khorasanizadeh, S. (2004). The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation. *Cell* *116*, 259-272.

Kirsh, V.A., Peters, U., Mayne, S.T., Subar, A.F., Chatterjee, N., Johnson, C.C., Hayes, R.B., and Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. (2007). Prospective study of fruit and vegetable intake and risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 1200-1209.

Klinge, C.M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* *65*, 227-251.

Knerr, S., and Schrenk, D. (2006). Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models. *Molecular Nutrition and Food Research* *50*, 897-907.

Kobayashi, A., Numayama-Tsuruta, K., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). CBP/p300 functions as a possible transcriptional coactivator of Ah receptor nuclear translocator (Arnt). *J. Biochem.* *122*, 703-710.

Kobayashi, A., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996). Cooperative interaction between AhR-Arnt and Sp1 for the drug-inducible expression of CYP1A1 gene. *J. Biol. Chem.* *271*, 12310-12316.

Kojima, T., Tanaka, T., and Mori, H. (1994). Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol. *Cancer Res.* *54*, 1446-1449.

Kong, D., Li, Y., Wang, Z., Banerjee, S., and Sarkar, F.H. (2007). Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the NF- κ B downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of VEGF in prostate cancer. *Cancer Res.* *67*, 3310-3319.

Kornberg, R.D., and Thomas, J.O. (1974). Chromatin structure: oligomers of the histones. *Science* *184*, 865-868.

Kraus, W.L., and Kadonaga, J.T. (1998). p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes and Development* *12*, 331-342.

Kumar, M.B., and Perdew, G.H. (1999). Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr.* *8*, 273-286.

Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* *51*, 941-951.

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116-120.

Le Douarin, B., You, J., Nielsen, A.L., Chambon, P., and Losson, R. (1998). TIF1 α : A possible link between KRAB zinc finger proteins and nuclear receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *65*, 43-50.

Lee, C.-., Guo, Y.L., Kuei, C.-., Chang, H.-., Hsu, J.-., Wang, S.-., and Liao, P.-. (2006). Human PCDD/PCDF levels near a pentachlorophenol contamination site in Tainan, Taiwan. *Chemosphere* *65*, 436-448.

Legube, G., and Trouche, D. (2003). Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep.* *4*, 944-947.

Levin, E.R. (2003). Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Molecular Endocrinology* *17*, 309-317.

Lewin, B. (2000). *Genes VII* (New York, USA: Oxford University Press Inc).

Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J.M., Qin, J., and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* *19*, 4342-4350.

Lin, P.-., Lin, C.-., Huang, C.-., Chuang, M.-., and Lin, P. (2007). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol. Lett.* *172*, 146-158.

Liu, X.-., and Bagchi, M.K. (2004). Recruitment of Distinct Chromatin-modifying Complexes by Tamoxifen-complexed Estrogen Receptor at Natural Target Gene Promoters in Vivo. *J. Biol. Chem.* *279*, 15050-15058.

Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2007). Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation. *Mol. Cell* *27*, 691-700.

Lu, H., Flores, O., Weinmann, R., and Reinberg, D. (1991). The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 10004-10008.

Mahadevan, L.C., Willis, A.C., and Barratt, M.J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* *65*, 775-783.

Maldonado, E. (1999). Transcriptional functions of a new mammalian TATA-binding protein-related factor. *J. Biol. Chem.* *274*, 12963-12966.

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995). The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* *83*, 835-839.

Martinez-Campa, C., Politis, P., Moreau, J.-., Kent, N., Goodall, J., Mellor, J., and Goding, C.R. (2004). Precise nucleosome positioning and the TATA box dictate requirements for the histone H4 tail and the bromodomain factor Bdf1. *Mol. Cell* *15*, 69-81.

Martucci, C.P., and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacology and Therapeutics* *57*, 237-257.

Maston, G.A., Evans, S.K., and Green, M.R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* *7*, 29-59.

Matthews, J., and Gustafsson, J.A. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* *4*, e016.

Matthews, J., Wihlén, B., Thomsen, J., and Gustafsson, J.-. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: Ligand-dependent recruitment of estrogen receptor α to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin- responsive promoters. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5317-5328.

McDonnell, D.P., and Norris, J.D. (2002). Connection and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296, 1642-1644.

McGuire, K.P., Ngoubilly, N., Neavyn, M., and Lanza-Jacoby, S. (2006). 3,3'-diindolylmethane and paclitaxel act synergistically to promote apoptosis in HER2/Neu human breast cancer cells. *J. Surg. Res.* 132, 208-213.

McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20, 321-344.

McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108, 465-474.

McMillan, B.J., and Bradfield, C.A. (2007). The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: Endogenous function in genetic model systems. *Mol. Pharmacol.* 72, 487-498.

Mehta, R.J., Zhang, Y., Karthik, C., Singh, B., Siegel, R.W., Borca-Tasciuc, T., and Ramanath, G. (2012). A new class of doped nanobulk high-figure-of-merit thermoelectrics by scalable bottom-up assembly. *Nature Materials*

Métivier, R., Penot, G., Hübner, M.R., Reid, G., Brand, H., Koš, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.

Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochimica Et Biophysica Acta - General Subjects* 1619, 263-268.

Moennikes, O., Loeppen, S., Buchmann, A., Andersson, P., Ittrich, C., Poellinger, L., and Schwarz, M. (2004). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor promotes hepatocarcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 64, 4707-4710.

Moreira, J.M.A., and Holmberg, S. (1999). Transcriptional repression of the yeast CHA1 gene requires the chromatin-remodeling complex RSC. *EMBO J.* 18, 2836-2844.

Morse, R.H. (2003). Getting into chromatin: How do transcription factors get past the histones? *Biochemistry and Cell Biology* 81, 101-112.

Muchardt, C., and Yaniv, M. (1993). A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SW12 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 12, 4279-4290.

Murphy, D.J., Hardy, S., and Engel, D.A. (1999). Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2724-2733.

Näär, A.M., Taatjes, D.J., Zhai, W., Nogales, E., and Tjian, R. (2002). Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation. *Genes and Development* 16, 1339-1344.

Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., and Grewal, S.I.S. (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110-113.

Nandi, S., Guzman, R.C., and Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3650-3657.

Narasimhan, T.R., Kim, H.L., and Safe, S.H. (1991). Effects of hydroxylated polychlorinated biphenyls on mouse liver mitochondrial oxidative phosphorylation. *J. Biochem. Toxicol.* 6, 229-236.

Nardulli, A.M., Greene, G.L., and Shapiro, D.J. (1993). Human estrogen receptor bound to an estrogen response element bends DNA. *Molecular Endocrinology* 7, 331-340.

Nardulli, A.M., Grobner, C., and Cotter, D. (1995). Estrogen receptor-induced DNA bending: Orientation of the bend and replacement of an estrogen response element with an intrinsic DNA bending sequence. *Molecular Endocrinology* 9, 1064-1076.

Nardulli, A.M., and Shapiro, D.J. (1992). Binding of the estrogen receptor DNA-binding domain to the estrogen response element induces DNA bending. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2037-2042.

Narlikar, G.J., Fan, H.-., and Kingston, R.E. (2002). Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108, 475-487.

National Toxicology Program. (2006). NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) (CAS No. 1746-01-6) in female Harlan Sprague-Dawley rats (Gavage Studies). *Natl. Toxicol. Program. Tech. Rep. Ser.* (521), 4-232.

Nebert, D.W., and Gonzalez, F.J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945-993.

Nehra, R., Riggins, R.B., Shajahan, A.N., Zwart, A., Crawford, A.C., and Clarke, R. (2010). BCL2 and CASP8 regulation by NF- κ B differentially affect mitochondrial function and cell fate in antiestrogen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *FASEB Journal* 24, 2040-2055.

Nelson, D.R. (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 1-10.

Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., and Nebert, D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.

Nilsson, S., Koehler, K.F., and Gustafsson, J.-. (2011). Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 778-792.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., and Gustafsson, J.-. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81, 1535-1565.

Nutter, L.M., Ngo, E.O., and Abul-Hajj, Y.J. (1991). Characterization of DNA damage induced by 3,4-estrone-o-quinone in human cells. *J. Biol. Chem.* 266, 16380-16386.

Nutter, L.M., Wu, Y.-., Ngo, E.O., Sierra, E.E., Gutierrez, P.L., and Abul-Hajj, Y.J. (1994). An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: Correlation with DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 23-28.

Ohtake, F., Fujii-Kuriyama, Y., and Kato, S. (2009). AhR acts as an E3 ubiquitin ligase to modulate steroid receptor functions. *Biochem. Pharmacol.* 77, 474-484.

Ohtake, F., Takeyama, K.-., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., *et al.* (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545-550.

Okamoto, A., Nikaido, T., Ochiai, K., Takakura, S., Saito, M., Aoki, Y., Ishii, N., Yanaihara, N., Yamada, K., Takikawa, O., *et al.* (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research* 11, 6030-6039.

Okoh, V., Deoraj, A., and Roy, D. (2011). Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1815, 115-133.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Molecular Endocrinology* 18, 1859-1875.

O'Malley, B.W. (2007). Coregulators: From whence came these "master genes". *Molecular Endocrinology* 21, 1009-1013.

O'Malley, B.W., and Kumar, R. (2009). Nuclear receptor coregulators in cancer biology. *Cancer Res.* *69*, 8217-8222.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* *270*, 1354-1357.

Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Opitz, U., Sahm, F., Ochs, K., Lutz, C., Wick, W., and Platten, M. (2011a). The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-d-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS ONE* *6*,

Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., *et al.* (2011b). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* *478*, 197-203.

Opitz, C.A., Wick, W., Steinman, L., and Platten, M. (2007). Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* *64*, 2542-2563.

Osborne, C.K. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res. Treat.* *51*, 227-238.

Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* *61*, 1053-1095.

Paige, L.A., Christensen, D.J., Grøn, H., Norris, J.D., Gottlin, E.B., Padilla, K.M., Chang, C.-., Ballas, L.M., Hamilton, P.T., McDonnell, D.P., and Fowlkes, D.M. (1999). Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3999-4004.

Park, J.-K., Shigenaga, M.K., and Ames, B.N. (1996). Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 2322-2327.

Patikoglou, G., and Burley, S.K. (1997). Eukaryotic transcription factor-DNA complexes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* *26*, 289-325.

Pettersson, K., and Gustafsson, J.-. (2001). Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annual Review of Physiology* *63*, 165-192.

Poellinger, L. (2000). Mechanistic aspects - The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Addit. Contam.* *17*, 261-266.

Poland, A., and Glover, E. (1979). An estimate of the maximum in vivo covalent binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to rat liver protein, ribosomal RNA, and DNA. *Cancer Res.* *39*, 3341-3344.

Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *22*, 517-554.

Potthoff, S.J., Romine, L.E., and Nardulli, A.M. (1996). Effects of wild type and mutant estrogen receptors on DNA flexibility, DNA bending, and transcription activation. *Molecular Endocrinology* *10*, 1095-1106.

Powell, E., Wang, Y., Shapiro, D.J., and Xu, W. (2010). Differential requirements of Hsp90 and DNA for the formation of estrogen receptor homodimers and heterodimers. *J. Biol. Chem.* *285*, 16125-16134.

Powell-Coffman, J.A., Bradfield, C.A., and Wood, W.B. (1998). *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 2844-2849.

Ptashne, M., and Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* *386*, 569-577.

Rahman, K.M.W., Ali, S., Aboukameel, A., Sarkar, S.H., Wang, Z., Philip, P.A., Sakr, W.A., and Raz, A. (2007). Inactivation of NF- κ B by 3,3'-diindolylmethane contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agent in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* *6*, 2757-2765.

Reed, G.A., Arneson, D.W., Putnam, W.C., Smith, H.J., Gray, J.C., Sullivan, D.K., Mayo, M.S., Crowell, J.A., and Hurwitz, A. (2006). Single-dose and multiple-dose administration of indole-3-carbinol to women: Pharmacokinetics based on 3,3'-diindolylmethane. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* *15*, 2477-2481.

Register, T.C., and Adams, M.R. (1998). Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *64*, 187-191.

Reményi, A., Schöler, H.R., and Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nature Structural and Molecular Biology* *11*, 812-815.

Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., and Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* *256*, 1193-1195.

Riby, J.E., Chang, G.H.F., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2000). Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* *60*, 167-177.

- Ricci, M.S., Toscano, D.G., Mattingly, C.J., and Toscano Jr., W.A. (1999). Estrogen receptor reduces CYP1A1 induction in cultured human endometrial cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 3430-3438.
- Roeder, R.G., and Rutter, W.J. (1969). Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* *224*, 234-237.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* *70*, 81-120.
- Roy, D., and Singh, K.P. (2004). Estrogen-induced genetic alterations and their role in carcinogenicity. *Curr. Genomics* *5*, 245-257.
- Russo, J., and Russo, I.H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *102*, 89-96.
- Russo, J., and Russo, I.H. (1999). Cellular basis of breast cancer susceptibility. *Oncol. Res.* *11*, 169-178.
- Safe, S. (1990). Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* *21*, 51-88.
- Safe, S., Astroff, B., Harris, M., Zacharewski, T., Dickerson, R., Romkes, M., and Biegel, L. (1991). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: Characterization and mechanism of action. *Pharmacology and Toxicology* *69*, 400-409.
- Safe, S., and Kim, K. (2008). Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* *41*, 263-275.
- Safe, S., and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor α cross-talk and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* *16*, 807-816.
- Serizawa, H., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (1993). Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription. *Nature* *363*, 371-374.
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* *103*, 843-852.
- Sherr, C.J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* *274*, 1672-1674.

- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* *95*, 927-937.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P., and Sutter, T.R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* *56*, 2979-2984.
- Shupnik, M.A. (2004). Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: Implications for cell proliferation. *Oncogene* *23*, 7979-7989.
- Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocr. Rev.* *25*, 45-71.
- Snykers, S., Henkens, T., De Rop, E., Vinken, M., Fraczek, J., De Kock, J., De Prins, E., Geerts, A., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2009). Role of epigenetics in liver-specific gene transcription, hepatocyte differentiation and stem cell reprogramming. *J. Hepatol.* *51*, 187-211.
- Sollner Webb, B., Camerini Otero, R.D., and Felsenfeld, G. (1976). Chromatin structure as probed by nucleases and proteases: Evidence for the central role of histones H3 and H4. *Cell* *9*, 179-193.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.-., and O'Malley, B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* *389*, 194-198.
- Spink, D.C., Lincoln II, D.W., Dickerman, H.W., and Gierthy, J.F. (1990). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 β -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 6917-6921.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., and Allis, C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14967-14972.
- Swedenborg, E., and Pongratz, I. (2010). AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* *268*, 132-138.
- Tajul-Arifin, K., Teasdale, R., Ravasi, T., Hume, D.A., Arakawa, T., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Mattick, J.S. (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Res.* *13*, 1416-1429.
- Tanaka, T., Ohkubo, S., Tatsuno, I., and Prives, C. (2007). hCAS/CSE1L Associates with Chromatin and Regulates Expression of Select p53 Target Genes. *Cell* *130*, 638-650.

Tang, Y.M., Wo, Y.-P., Stewart, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Sutter, T.R., and Greenlee, W.F. (1996). Isolation and characterization of the human cytochrome p450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.* *271*, 28324-28330.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: Lessons from professional pocket pickers. *Nature Structural and Molecular Biology* *14*, 1025-1040.

Taylor, R.T., Wang, F., Hsu, E.L., and Hankinson, O. (2009). Roles of coactivator proteins in dioxin induction of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast cancer cells. *Toxicological Sciences* *107*, 1-8.

Terry, P., Wolk, A., Persson, I., and Magnusson, C. (2001). Brassica vegetables and breast cancer risk. *JAMA* *285*, 2975-2977.

Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *41*, 105-178.

Toniolo, P.G., Levitz, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Banerjee, S., Koenig, K.L., Shore, R.E., Strax, P., and Pasternack, B.S. (1995). A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.* *87*, 190-197.

Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Kyo, S., Kanaya, T., Inoue, M., and Yokoi, T. (2004). Human CYP1B1 Is Regulated by Estradiol via Estrogen Receptor. *Cancer Res.* *64*, 3119-3125.

Tyler, J.K., and Kadonaga, J.T. (1999). The "dark side" of chromatin remodeling: Repressive effects on transcription. *Cell* *99*, 443-446.

Uno, S., Dragin, N., Miller, M.L., Dalton, T.P., Gonzalez, F.J., and Nebert, D.W. (2008). Basal and inducible CYP1 mRNA quantitation and protein localization throughout the mouse gastrointestinal tract. *Free Radical Biology and Medicine* *44*, 570-583.

Utle, R.T., Ikeda, K., Grant, P.A., Côté, J., Steger, D.J., Eberharter, A., John, S., and Workman, J.L. (1998). Transcriptional activators direct histone acetyltransferase complexes to nucleosomes. *Nature* *394*, 498-502.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* *9*, 1269-1274.

van Holde, K.E. (1989). *Chromatin*. Springer-Verlag, New York

Vilar, J.M.G., and Saiz, L. (2005). DNA looping in gene regulation: From the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. *Current Opinion in Genetics and Development* 15, 136-144.

Viluksela, M., Bager, Y., Tuomisto, J.T., Scheu, G., Unkila, M., Pohjanvirta, R., Flodström, S., Kosma, V.-., Mäki-Paakkanen, J., Vartiainen, T., *et al.* (2000). Liver tumor-promoting activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in TCDD-sensitive and TCDD-resistant rat strains. *Cancer Res.* 60, 6911-6920.

Wallberg, A.E., Neely, K.E., Hassan, A.H., Gustafsson, J.-., Workman, J.L., and Wright, A.P.H. (2000). Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor $\tau 1$ activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2004-2013.

Wang, F., Samudio, I., and Safe, S. (2001). Transcriptional activation of rat creatine kinase B by 17 β -estradiol in MCF-7 cells involves an estrogen responsive element and GC-rich sites. *J. Cell. Biochem.* 84, 156-172.

Wang, S., and Hankinson, O. (2002). Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex. *J. Biol. Chem.* 277, 11821-11827.

Wang, W., Smith III, R., Burghardt, R., and Safe, S.H. (1997). 17 β -Estradiol-mediated growth inhibition of MDA-MB-468 cells stably transfected with the estrogen receptor: Cell cycle effects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 133, 49-62.

Wang, W., Smith III, R., and Safe, S. (1998). Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenicity in MCF-7 cells: Modulation of hormone-induced cell cycle enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 239-248.

Wang, Z., Yu, B.W., Rahman, K.M.W., Ahmad, F., and Sarkar, F.H. (2008). Induction of growth arrest and apoptosis in human breast cancer cells by 3,3-diindolylmethane is associated with induction and nuclear localization of p27kip. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 341-349.

Wassom, J.S., Huff, J.E., and Loprieno, N. (1977). A review of the genetic toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Mutat. Res.* 47, 141-160.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.

Wattenberg, L.W., and Loub, W.D. (1978). Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally occurring indoles. *Cancer Res.* 38, 1410-1413.

- Weiss, S.B., and Gladstone, L. (1959). A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid [17]. *J. Am. Chem. Soc.* *81*, 4118-4119.
- Wolffe, A.P., and Hayes, J.J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res.* *27*, 711-720.
- Workman, J.L., and Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annual Review of Biochemistry* *67*, 545-579.
- Wortelboer, H.M., De Kruif, C.A., Van Iersel, A.A.J., Falke, H.E., Noordhoek, J., and Blaauboer, B.J. (1992). Acid reaction products of indole-3-carbinol and their effects on cytochrome P450 and phase II enzymes in rat and monkey hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* *43*, 1439-1447.
- Wu, S.-., and Chiang, C.-. (1998). Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription in vitro. *J. Biol. Chem.* *273*, 12492-12496.
- Wu, S.-., Thomas, M.C., Hou, S.Y., Likhite, V., and Chiang, C.-. (1999). Isolation of mouse TFIID and functional characterization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription. *J. Biol. Chem.* *274*, 23480-23490.
- Wyde, M.E., Cambre, T., Lebetkin, M., Eldridge, S.R., and Walker, N.J. (2002). Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences* *68*, 295-303.
- Wyde, M.E., Wong, V.A., Kim, A.H., Lucier, G.W., and Walker, N.J. (2001). Induction of hepatic 8-oxo-deoxyguanosine adducts by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Sprague-Dawley rats is female-specific and estrogen-dependent. *Chem. Res. Toxicol.* *14*, 849-855.
- Xu, J., and O'Malley, B.W. (2002). Molecular mechanisms and cellular biology of the steroid receptor coactivator (SRC) family in steroid receptor function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* *3*, 185-192.
- Xu, J., Wu, R.-., and O'Malley, B.W. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nature Reviews Cancer* *9*, 615-630.
- Xue, L., Firestone, G.L., and Bjeldanes, L.F. (2005). DIM stimulates IFN γ gene expression in human breast cancer cells via the specific activation of JNK and p38 pathways. *Oncogene* *24*, 2343-2353.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G.T., Young, M.K., Côté, J., and Wang, W. (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol. Cell* *2*, 851-861.

Young, R.A. (1991). RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 689-715.

Yu, C., York, B., Wang, S., Feng, Q., Xu, J., and O'Malley, B.W. (2007). An Essential Function of the SRC-3 Coactivator in Suppression of Cytokine mRNA Translation and Inflammatory Response. *Mol. Cell* 25, 765-778.

Yu, H., and Jove, R. (2004). The stats of cancer - New molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer* 4, 97-105.

Yuan, C.-., Ito, M., Fondell, J.D., Fu, Z.-., and Roeder, R.G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7939-7944.