



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT 3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**  
**Céline Basset**

**Le 25 Mars 2014**

**Titre :**

**Api5 : un nouveau co-facteur du récepteur aux œstrogènes ER $\alpha$  impliqué dans la progression tumorale des carcinomes mammaires**

---

ED BSB : Biotechnologies, Cancérologie

**Unité de recherche :**

UMR 1037-CRCT Equipe 15

**Directeur(s) de Thèse :**

Dr Eric Lacazette

**Rapporteurs :**

Dr Marie-Christine Rio, Dr Jean-Luc Poyet, Pr Philippe Birembaut

**Autre(s) membre(s) du jury :**

Pr Monique Courtade Saïdi

# SOMMAIRE

<b>RESUME</b>	<b>4</b>
<b>MOTS CLE</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATIONS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>9</b>
<b>I-Le cancer du sein</b>	<b>9</b>
<b>1-Epidémiologie du cancer du sein invasif</b>	<b>9</b>
<b>2- Facteurs de risques</b>	<b>10</b>
<b>3-Histologie et anatomie et cytologie pathologiques de la glande mammaire</b>	<b>17</b>
3.1- Histologie	17
3.2-Histologie, cellules souches et carcinogénèse de la glande mammaire	22
3.3- Anatomie et cytologie pathologiques des tumeurs épithéliales de la glande mammaire, classification	25
3.3.1-Type histologique de cancers	26
3.3.2-Grade	27
3.3.3-Stade	29
3.3.4 -Tests moléculaires mettant en évidence le Récepteur aux œstrogènes, Récepteur à la progestérone et l'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2	29
<b>4 -Thérapeutiques du cancer du sein</b>	<b>32</b>
4.1-Une nouvelle classification consensus pour la prise en charge thérapeutique	32
4.2-Les antagonistes des œstrogènes	33
4.3-Inhibition des oestrogènes	35
<b>II -Les œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes</b>	<b>37</b>
<b>1 Les œstrogènes</b>	<b>37</b>
<b>2 Les récepteurs aux oestrogènes</b>	<b>42</b>
2.1 Caractérisation et localisation des ERs	42
2.2-Rôle des ER dans la fonction et le développement des organes et plus particulièrement de la glande mammaire	44
2.3-Rôle des ER dans le développement des lésions carcinomateuses de la glande mammaire	46
2.4 Structures et mécanismes d'action moléculaire des ERs	48
2.4.1 Structures des protéines ERs	48
2.4.2-Les différents mécanismes d'action des récepteurs aux oestrogènes	54
2.5 Les co-facteurs	65
2.5.1-Définition	65
2.5.2-Interaction des co-facteurs avec ER	65
2.5.3-Fonction des co-facteurs	73
2.5.4-Modélisation du mode d'action des co-facteurs	79
2.6-Les modifications post-traductionnelles (MPT) d'ER	82

<b>III-L'inhibiteur d'Apoptose 5 : API5</b>	<b>87</b>
<b>1-Structure</b>	<b>87</b>
1.1-Le gène API5	87
1.2-La protéine Api5	88
1.2.1-Structure primaire	88
1.2.2 Crystal de la protéine Api5	90
1.2.3-Les différentes isoformes et la conservation de la protéine Api5	95
1.2.4 Réalisation d'une souris knockout Api5	97
<b>2-Régulations d'Api5</b>	<b>97</b>
<b>3-Les Fonctions d'Api5</b>	<b>101</b>
3.1 Api5 et Apoptose	101
3.2 Api5, la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire	110
3.3 Api5, migration et invasion	112
<b>4-Les implications d'Api5 en pathologies cancéreuses</b>	<b>115</b>
<b><i>CONTEXTE ET OBJECTIF DE NOTRE ETUDE SUR LES RELATIONS ENTRE API5 ET ER<math>\alpha</math> DANS LE CANCER DU SEIN</i></b>	<b>118</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>120</b>
<b>I-Api5 : Un nouveau co-facteur du récepteur aux oestrogènes ER<math>\alpha</math> impliqué dans la progression tumorale des adénocarcinomes mammaires</b>	<b>120</b>
ABSTRACT	120
INTRODUCTION	122
RESULTS	125
DISCUSSION	131
MATERIALS AND METHODS	135
TABLES, FIGURES, LEGENDS	144
REFERENCES	161
<b>II Résultats complémentaires</b>	<b>174</b>
<b>1- Api5 interagit avec d'autres facteurs intervenant dans la transcription</b>	<b>174</b>
<b>2-Cas particuliers</b>	<b>176</b>
<b>III Contribution au travail de thèse de Marina GARCIA-JOVE NAVARRO : Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur E2F1 par Api5</b>	<b>180</b>

<b>SYNTHESE : résultats, discussions, conclusions et perspectives</b>	<b>182</b>
<b>1-Api5 régule la transcription de gènes cibles d'ER<math>\alpha</math> impliqués dans l'apoptose</b>	<b>182</b>
<b>2- Api5 régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire</b>	<b>183</b>
<b>3- Api5 est nécessaire à la Croissance tumorale</b>	<b>185</b>
<b>4- La perte d'expression d'Api5 est associée à l'invasion</b>	<b>185</b>
<b>5-Api5 co-facteur de la transcription ER<math>\alpha</math> dépendante</b>	<b>188</b>
5.1-Api5 est un co-activateur de la transcription ER $\alpha$ dépendante sur des sites de régulation ERE et AP1	<b>188</b>
5.2 Api5 est un co-répresseur de la transcription ER $\alpha$ dépendante	<b>188</b>
<b>6-Api5 et le système mitochondrial</b>	<b>190</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>191</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>193</b>

## **RESUME**

La recherche de nouveaux facteurs pronostiques et les nouvelles cibles thérapeutiques sont en plein essor et présentent de nouveaux espoirs en ce qui concerne la prise en charge et la thérapie ciblée dans le cancer du sein. Depuis longtemps l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER) représente l'un des principaux facteurs de pronostic et constitue avec les œstrogènes une cible thérapeutique incontournable. Les co-régulateurs de l'ER sont souvent dérégulés et participent ainsi, si ce n'est à la genèse du cancer, du moins à son développement ainsi qu'aux mécanismes cellulaires d'échappement thérapeutique. Ainsi, une meilleure connaissance de ces molécules pourrait apporter un bénéfice dans la prise en charge des patients. De plus étant situé en amont de la voie transcriptionnelle, leur ciblage permettrait d'atteindre simultanément plusieurs voies de signalisation et pourrait permettre d'empêcher les cellules de développer des mécanismes de résistance. Nous présentons dans ce travail un nouveau co-régulateur d'ER : Api5 qui est reconnu comme un facteur anti-apoptotique. Nous avons analysé l'expression d'Api5 dans les carcinomes mammaires par une étude immunohistochimique prospective et nous avons montré que la perte d'Api5 était associée à des facteurs de mauvais pronostic et qu'il était co-localisé avec ER $\alpha$ . Nous avons aussi montré que sa présence était nécessaire à la croissance tumorale. Nous avons constaté qu'Api5 régula la transcription de gènes dépendant du ER $\alpha$  en se fixant sur l'ADN sur ses éléments de réponse (ERE) ou indirectement en interagissant avec la protéine activatrice 1 (Activator protéine 1 : AP1). Enfin, nous avons observé que la séquence LXXLL d'Api5 était nécessaire à la liaison directe entre Api5 et le domaine C d'ER $\alpha$ . Cette étude décrit pour la première fois l'expression immunohistochimique d'Api5 dans des cancers et caractérise les relations fonctionnelles et physiques liant Api5 à l'ER $\alpha$ . Nous proposons donc Api5 comme un nouveau co-facteur de l'ER $\alpha$ , pouvant potentiellement représenter une nouvelle cible thérapeutique des cancers du sein.

## ***MOTS CLES***

Api5, cancer du sein, œstrogènes, récepteurs aux œstrogènes, récepteur à la progestérone.

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

Ac : activité acetyl transférase

ADN : Acide Désoxyribonucleique

AF-1/AF-2 : Activation function 1/2

Akt : proteine kinase B

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

AP1 : Activator proteine 1

Api5 : Apoptosis inhibitor 5

ARC : SREBP-interacting complex activator recruited cofactor

ARN : Acide Ribonucleique

ARNm : ARN messenger

bHLH : basic helix-loop-helix

BRG1: brahma-related gene 1

CARM-1: coactivator-associated arginine methyltransferase 1

CBP : CREB binding protein

CDK8 : cyclin-dependent protein serine/threonine kinase 8

CHD : Chromodomain/helicase/DNA-binding domain

CIS : Carcinome in situ

CoReg : co-regulateurs

CoRNR : ('corner') box

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

DAB : Diaminobenzidine

DBD : DNA Binding Domain

DRIP : vitamin D receptor interacting proteins complex activator

E1: oestrone

E2 : 17 $\beta$  œstradiol

E3 : oestriol oestetrol

E4 : oestetrol

E6-AP : ubiquitin ligase E6 associated protein (ou ubiquitin-protein ligase E3A)

E2F1 : Facteur-1 liant le promoteur E2

EGF : Epidermal Growth Factor

ER : récepteur aux œstrogènes

ER $\alpha$  : récepteur aux œstrogènes  $\alpha$

ER $\beta$  : récepteur aux œstrogènes  $\beta$

ERE : Estrogen response element

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

GMPc : Guanylate cyclase

GRIP-1 : glutamate receptor-interacting protein 1

H : hinge (domaine charnière d'ER)

HAT : histone actéyltransférase

HDAC : histone déacétylase

HER2 : human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HSP 90: heat shock protein 90

IGF-1 : insuline Growth factor-1

IHC : immunohistochimie

ISWI : imitation SWI

KO : Knockout

LBD : ligand binding domain

MAPK : mitogen-activated protein kinases

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog (ou E3 ubiquitin-protein ligase)

miARN : micro ARN

NCoR : nuclear receptors corepressor

NF- $\kappa$ B : nuclear factor- $\kappa$ B

NO : Monoxyde d'azote

P : phosphorylation

p300 : Histone acetyltransferase p300

PERM1 : modulateur peptidique-1 du ER

PGC-1 $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha

PGC-1 $\beta$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PR : récepteur à la progestérone

PRMT1 : Protein arginine N-methyltransferase 1

RAR : récepteurs à l'acide rétinoïque

RAS : famille de GTPase

RE : élément de réponse aux facteurs de transcriptions autres qu'ER

RNApolII : ARN polymérase II

RR : risque relatif

RTK : récepteur à tyrosine kinase

SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1

SERM : selective estrogen receptor modulator

SMRT : silencing mediator of retinoid and thyroid receptors



SP-1 : spécifique protein-1

SRC : Steroid Receptor Co-activator

SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

SWI : yeast mating type switching

SNF : Sucrose Non Fermentable

SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non Fermentable

THS : traitements hormonaux substitutifs

TF : Transcription factor

TFF1 : trefoil factor 1 (PS2)

TRAP : thyroid hormone receptor-associated protein mediator of RNA polymerase II  
transcription

TR : récepteur aux hormones thyroïdiennes

# **INTRODUCTION**

## **I-Le cancer du sein**

### **1-Épidémiologie des carcinomes mammaires invasifs**

Les carcinomes invasifs mammaires sont les cancers les plus fréquents chez la femme et représentent 23% de tous les cancers dans le monde et 27% dans les pays développés (Ferlay, 2008). Comme pour la plupart des tumeurs épithéliales leur incidence augmente rapidement avec l'âge. Les populations qui présentent un risque élevé se trouvent en Australie, en Europe et en Amérique du Nord. Dans les pays moins développés, comme l'Afrique Sub-Saharienne, le Sud et l'Est de l'Asie incluant le Japon, le risque de carcinome mammaire est faible. Il a été constaté une augmentation de l'incidence de ces carcinomes chez les migrants de pays où le risque est faible vers des pays où le risque est élevé. L'environnement semble donc jouer un rôle important dans le développement de ces tumeurs. Par ailleurs, actuellement, son incidence augmente dans les pays en voie de développement et diminue dans les pays développés où s'est mis en place un dépistage systématique par mammographie ainsi qu'une diminution de l'utilisation d'hormones substitutives chez la femme ménopausée. Le pronostic de ce cancer est bon s'il est diagnostiqué à un stade précoce. De plus les avancées thérapeutiques sont particulièrement marquantes depuis le début des années 1990 grâce à l'association du dépistage, des traitements adjuvants hormonaux et chimiothérapeutiques (Lakhani et al, 2012).

## **2-Facteurs de risques**

L'origine des cancers du sein est multifactorielle, mais est plus particulièrement associée aux facteurs relatifs à la reproduction et aux hormones stéroïdes sexuelles.

### **Facteurs liés à la reproduction**

La maladie est plus fréquente chez les femmes qui ont eu leurs menstruations tôt, une ménopause tardive, qui sont restées nullipares ou qui ont eu peu d'enfants et à un âge tardif. L'infertilité et l'absence de lactation apparaissent aussi comme des facteurs de risques (Lakhani et al, 2012).

### **Les hormones endogènes**

Les hormones stéroïdes sexuelles (androgènes, œstrogènes, progestérone) jouent un rôle important dans le développement des carcinomes mammaires. L'incidence de ces carcinomes augmente plus avant la ménopause (8% par an) qu'après (2% par an) où le taux d'hormones est plus faible. Ce taux est plus faible après la ménopause car la production ovarienne d'œstrogènes et de progestérone va cesser et la production d'androgènes va diminuer (Colditz et al, 2000). Cependant, chez les femmes ménopausées, il persiste quand même une production d'hormones stéroïdes périphériques (par exemple par le tissu adipeux ou la surrénale) qui se traduit par des taux d'hormones plus ou moins important chez ces femmes. C'est ainsi qu'il a été constaté qu'après la ménopause plus la concentration sanguine des œstrogènes et des androgènes est importante plus le risque de développer des carcinomes mammaires augmente. Cette augmentation du risque est encore plus importante en ce qui concerne le développement des tumeurs positives pour le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) (Missmer et al, 2004). En ce qui concerne les femmes pré-ménopausées, le groupe « Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2013 » a étudié

l'association entre le risque de carcinome mammaire et les concentrations sanguines des hormones stéroïdes sexuelles. Pour cela, les antécédents hormonaux de 767 femmes pré-ménopausées atteintes de carcinomes mammaires et 1699 femmes pré-ménopausées non atteintes ont été répertoriés. Dans cette étude ils ont montré que le risque de carcinome mammaire était associé aux concentrations d'hormones circulantes pour l'œstradiol, l'œstrone, l'androstenedione, la dehydroépiandrosterone sulphate et la testostérone. Par contre, le risque de cancer mammaire n'était pas associé à la concentration circulante de progestérone. Par ailleurs, dans d'autres études il a été montré que des concentrations élevées de prolactine sont aussi associées à un risque augmenté de carcinome mammaire chez la femme pré et post-ménopausée (Tworoger and al, 2008 ; Su et al, 2009). Enfin, les concentrations d'IGF-1 ont également été associées au risque de carcinome mammaire chez la femme pré-ménopausée mais pas post-ménopausée (Renehan et al, 2006).

### **Les hormones exogènes**

#### **Les contraceptifs oraux**

Pendant longtemps les contraceptifs ont été soupçonnés d'augmenter le risque de carcinome mammaire car ils contiennent des œstrogènes et de la progestine (hormone synthétique ressemblant à la progestérone) à des concentrations plus élevées que celles d'un cycle ovulatoire. Les données récoltées par le Collaborative group on Hormonal Factors in Breast Cancer en 1996 sur plus de 50 études (53 000 cas) ont montré qu'il n'y avait presque aucune augmentation du risque de cancer du sein chez les femmes ayant pris des contraceptifs, même pendant plus de dix ans. Par contre, il y avait une augmentation modérée du risque (risque relatif (RR) = 1.24) chez les femmes qui étaient en cours d'utilisation de contraceptifs oraux ou qui les avaient arrêtés depuis moins de 10 ans. En conclusion de ces études, l'International Agency for Research on Cancer (IARC), a classé les contraceptifs

oraux comme des carcinogènes de type I. Une étude américaine plus récente portant sur 4575 femmes atteintes d'un cancer du sein et 4682 cas contrôles âgées de 35 à 64 ans (Marchbanks et al, 2002) a montré qu'il n'y avait aucun risque même chez les usagers en cours de traitement quelque soit la dose d'oestrogènes (éthinyli estradiol ou mestranol) utilisée, quelque soit le type de progestine et quelque soit l'âge des patientes.

### **Traitement de substitution hormonale chez la femme ménopausée**

En 1997, une étude très large réanalysant 51 études épidémiologiques (soit 52 705 cas de femmes atteintes de carcinomes mammaires et 108 411 femmes contrôles) a été menée dans le but de mesurer les risques de cancer du sein lié à la prise de traitements hormonaux substitutifs (THS) (Collaborative group, 1997). Cette étude a montré que la prise de ces traitements augmentait le risque de carcinome mammaire. Le RR, dans cette étude, était de 1,35 chez les femmes qui étaient sous THS depuis plus de 5 ans. Après 5 ans le RR augmentait proportionnellement avec la durée d'utilisation. Il est à noter que cette augmentation du risque est similaire à celle observée chez les femmes qui ont une ménopause tardive. Par ailleurs dans cette même étude il a été constaté que l'augmentation du risque de carcinome mammaire s'arrêtait après l'arrêt du traitement et disparaissait au bout de 5 ans d'arrêt. Une étude plus récente (Beral V, 2003) a été effectuée sur 1 084 110 femmes du Royaume Uni âgées de 50 à 64 ans. Ces femmes ont été incluses dans l'étude "the Million Women Study" entre 1996 et 2001 et ont été suivies pour l'incidence et la mortalité des carcinomes mammaires. Les patientes en cours de THS au moment du recrutement ont eu un risque plus important de développer un carcinome mammaire (RR = 1,66) et d'en mourir (RR = 1,22) que celles qui n'en avaient jamais consommé. L'incidence du cancer du sein était plus importante pour les traitements associant des œstrogènes à de la progestérone (RR=2) que pour les autres traitements substitutifs, œstrogènes seuls (RR=1.30) et Tibolone (progestatif)

(RR = 1.45). Les résultats étaient similaires quel que soit le type d'œstrogènes (œstrogène équin ou œstradiol) et de progestagènes (medroxyprogestérone acétate, norethisterone, norgestrel ou levonorgestrel) et quels que soient les doses et les modes d'administration. Pour chaque type de traitement hormonal le risque de cancer du sein augmentait, dans cette étude aussi, proportionnellement à la durée totale d'utilisation. Pour 10 ans d'utilisation le risque était de 5 carcinomes mammaires supplémentaires pour 1000 femmes pour une thérapie substitutive comprenant les œstrogènes seuls et de 19 pour 1000 pour une thérapeutique associant les œstrogènes et des progestagènes. Les patientes ayant arrêté leur traitement ne présentaient pas d'augmentation du risque d'incidence ni de mortalité. De plus il a été montré dans cette étude que le risque était d'autant plus élevé chez les femmes minces. En résumé, les femmes en cours d'utilisation de traitement substitutif ont un risque accru de survenue de carcinome mammaire et de mortalité par ce cancer et cet effet est augmenté chez les femmes qui prennent une association d'œstrogènes et de progestérone.

### **Autres facteurs de risques**

Dans ce paragraphe nous allons brièvement développer les autres facteurs de risques endogènes ou exogènes et environnementaux qui peuvent être associés à une modification du risque de carcinome mammaire puis nous aborderons les facteurs génétiques. Enfin, nous terminerons par une présentation rapide des nouveaux facteurs de risques en cours d'évaluation.

### **Adiposité, activité physique et nutrition, alcool et tabac**

Dans les populations industrielles, le risque de cancers du sein est inversement proportionnel à la masse adipeuse chez les femmes pré-ménopausées et c'est l'inverse chez les femmes ménopausées (Ursing et al, 1995). Chez les femmes pré-ménopausées

l'augmentation de la masse adipeuse s'associe à des cycles anovulatoires plus fréquents et donc à une exposition hormonale endogène plus faible. A l'inverse, le surpoids et l'obésité ont été incriminés dans 10% des cas de carcinomes mammaires chez la femme ménopausée aux Etats Unis (IARC, 2002 ; Lakhani, 2012). Cela s'explique par le fait que chez les femmes ménopausées c'est le tissu adipeux qui est à l'origine d'une grande partie de la production d'œstrogènes. Ainsi, les femmes en surpoids ou obèses ménopausées sont soumises à un taux plasmatique d'œstrogènes plus important que les autres.

En ce qui concerne les régimes alimentaires, le régime dit "non sain" des pays développés (Kabat et al, 2009 ; Alexander et al, 2010) et au contraire le régime à base de fruits et de légumes (Boffetta et al, 2010) dit "sain" ne sont pas associés aux risques de carcinomes mammaires. Néanmoins, les consommations de viande rouge, surtout grillée (Kabat et al, 2009), et d'alcool même à faible dose ont été associés à un risque accru de carcinomes mammaires (Zang et al, 2003). Par ailleurs les phyto-oestrogènes sont des composés non stéroïdiens présents dans de nombreux végétaux (ex fèves de soja), qui partagent des similitudes de structure avec les œstrogènes et qui sont particulièrement associés au régime alimentaire en Asie. Il est suggéré qu'il existe une relation inverse entre un régime alimentaire riche en phyto-œstrogènes et l'incidence du cancer du sein. En effet, les femmes asiatiques ont un risque 4 à 6 fois plus faible de développer un cancer du sein que les femmes occidentales (Adlercreutz et al, 2002).

Selon le Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2002, le RR de carcinome mammaire augmente de 7,1% pour chaque 10g d'alcool ingéré par jour, ce qui implique que 4% de ces carcinomes sont, dans les pays développés, attribuables à l'alcool.

En ce qui concerne le tabagisme actif et passif il a été établi récemment par une étude canadienne (Johnson et al, 2009) qu'il était responsable d'une augmentation du risque de carcinomes mammaires chez les femmes pré et post ménopausées. Enfin, un niveau

d'activités physiques élevées est corrélé avec une réduction du risque de cancer du sein (IARC 2002) et il est donc recommandé d'exercer une activité physique soutenue tout au long de la vie (Maruti et al, 2008).

### **Facteurs génétiques**

Les études portant sur les antécédents familiaux et sur les jumeaux montrent l'implication importante de la susceptibilité génétique dans le développement des carcinomes mammaires. Néanmoins peu de gènes ont été identifiés. De rares mutations génétiques touchant 11 gènes différents sont à l'origine d'une augmentation du risque de développer un carcinome mammaire (Varghese et al, 2010). Parmi ces 11 gènes, les syndromes les plus importants en clinique sont associés à des mutations de *BRCA1* et *BRCA2* et de *TP53*. Le syndrome BRCA-1 et BRCA-2 est hérité de façon autosomique dominant et est associé avec un risque important de cancer du sein et de l'ovaire. L'incidence en Europe varie de 0.12 % à 0.32%. En ce qui concerne la mutation de *TP53*, elle va augmenter le risque de carcinome mammaire dans un contexte de syndrome de Li-Fraumeni. Ce syndrome se transmet aussi de façon autosomique dominante et se caractérise principalement par la survenue de sarcomes, de carcinomes mammaires, de tumeurs cérébrales et de la surrenale. Son incidence mondiale est de 0.02 % à 0,005% (Lakhani et al, 2012).

### **Nouveaux facteurs de risques en cours d'évaluation**

Récemment de nouveaux facteurs de risque facilement mesurables ont été étudiés et sont en cours d'évaluation.

Il s'agit premièrement de l'appréciation de la densité du tissu mammaire par mammographie. En effet, il a été observé que le risque de carcinome mammaire était plus important chez les femmes qui présentaient un parenchyme mammaire dense. Un parenchyme



mammaire est diagnostiqué dense, en mammographie, lorsqu'il est riche en stroma ou en tissu épithélial et qu'il contient peu de tissu adipeux.

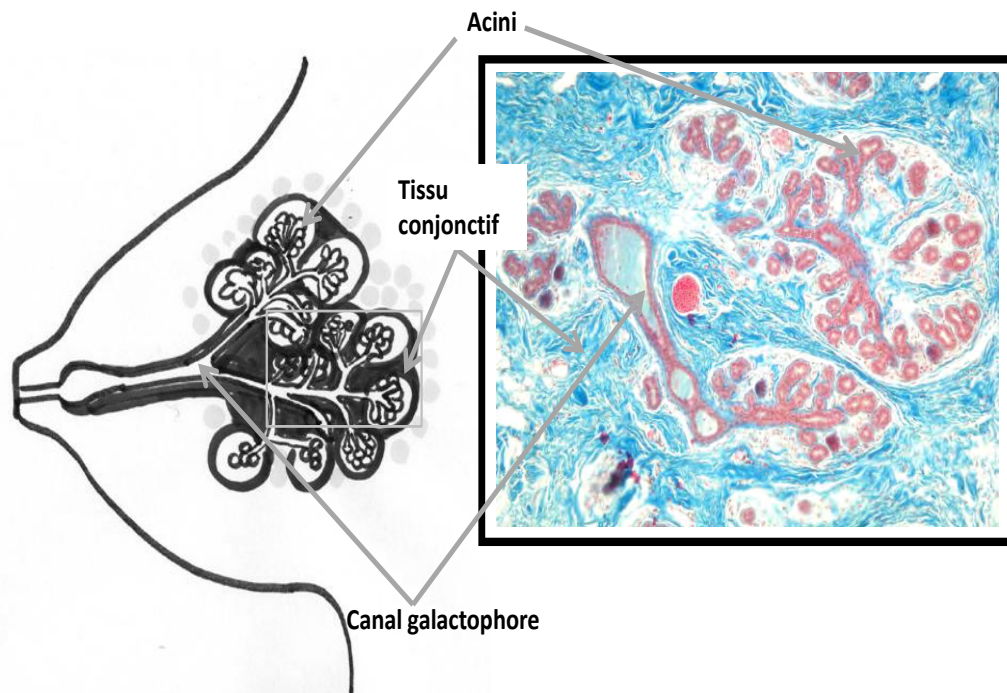
La densité osseuse apparaît aussi comme un paramètre mesurable, pouvant être considéré comme un facteur de risque, dans le sens où elle représente l'exposition aux œstrogènes à laquelle une femme a été soumise au cours de sa vie. Ainsi, plus la densité osseuse est importante plus il y aurait de risque de développer un carcinome mammaire et à l'inverse les femmes qui présenteraient une forte diminution de leur taille ou des fractures en vieillissant auraient un risque moindre (Pour revue Santen et al, 2007).

### **3- Histologie et anatomie et cytologie pathologiques de la glande mammaire**

#### **3.1 -Histologie**

*D'après Collins LC, et al 2007*

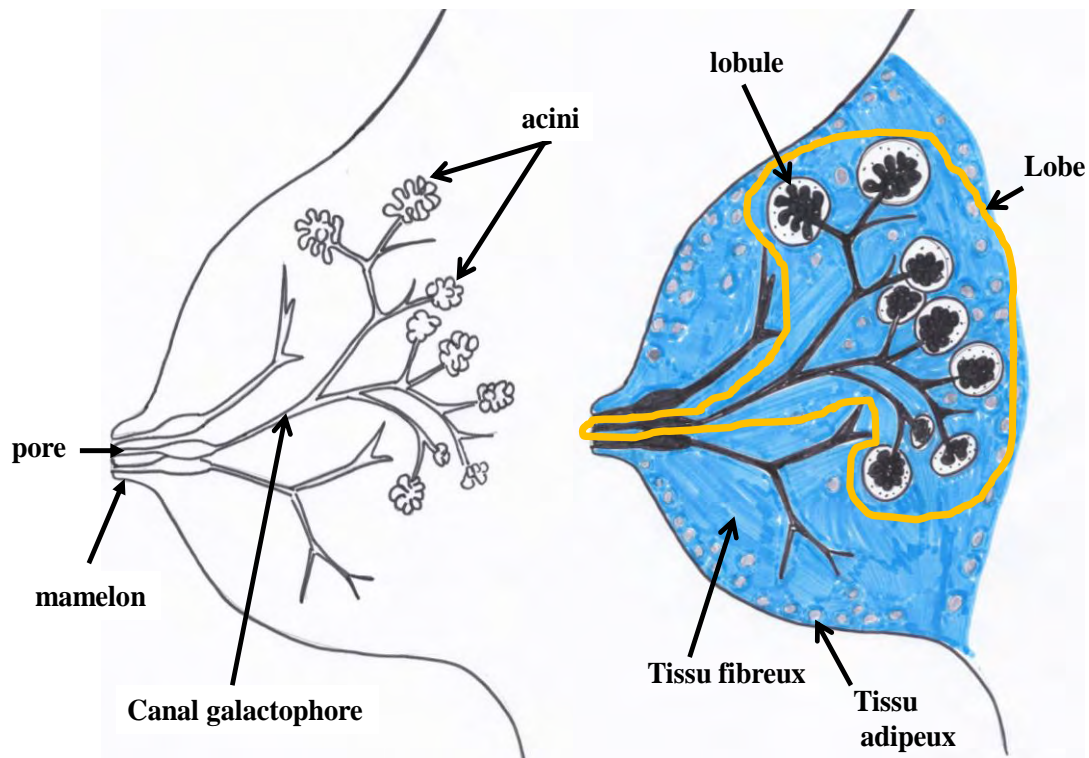
La glande mammaire est une glande exocrine, composée, acino-alvéolaire. Elle est constituée de canaux galactophores ramifiés et de portions sécrétrices. En dehors de la grossesse et de la lactation, la glande est dite au repos et les portions sécrétrices forment des bouquets de petites sphères appelés acini (figure 1). Pendant la grossesse et la lactation, les portions sécrétrices se multiplient, se dilatent et forment des alvéoles.



**Figure 1. Coupe sagittale d'une glande mammaire au repos.** Le schéma de la glande mammaire à gauche est comparé avec la photographie de glande observée en MO (grossissement x100, coloration au trichrome de Masson) à droite. Sur la photographie, le bleu indique le collagène du tissu conjonctif, les acini et canaux apparaissent roses.

La glande se divise en lobes et en lobules. Un lobe est constitué de tissu épithélial et de tissu conjonctif. Le tissu épithélial d'un lobe correspond à un canal galactophore et à toutes ses ramifications jusqu'aux acini. Le tissu conjonctif qui le soutient est un tissu conjonctif dense. Un lobule correspond à une sous unité du lobe. Il s'agit également d'une structure épithéliale et conjonctive. La partie épithéliale comprend la terminaison de la dernière ramification du canal galactophore et les acini qui en naissent. Le tissu conjonctif dans lequel se trouve ces structures épithéliales lobulaires est un tissu conjonctif lâche appelé

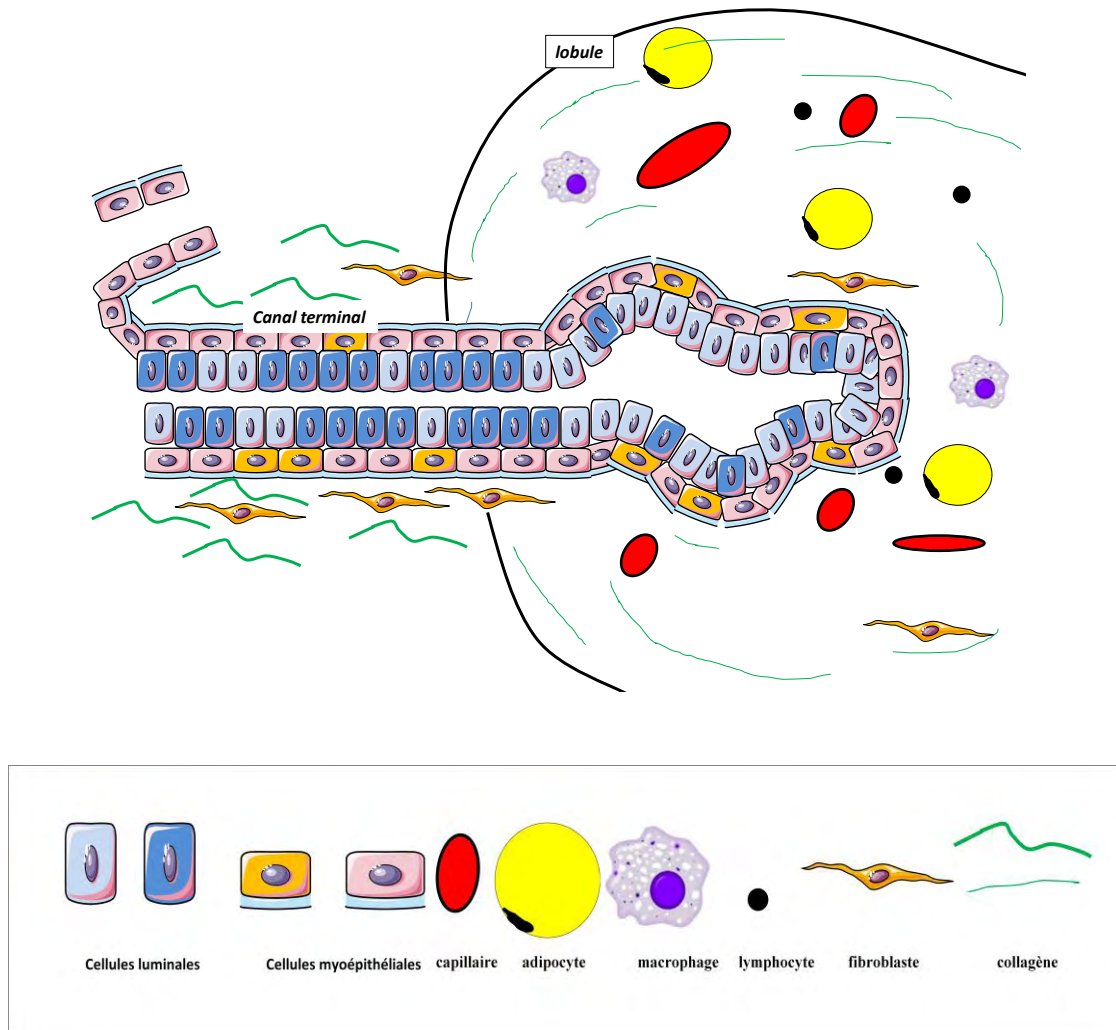
le tissu palléal. On observe plusieurs lobules par lobes et il existe en moyenne 12 lobes par glande mammaire (figure 2).



**Figure 2. Schéma d'Histologie de la glande mammaire en coupe transversale :** Gauche : les canaux galactophores naissent au niveau de pores situés à la surface cutanée du mamelon. En pénétrant vers la profondeur de la glande, ils vont se ramifier et les dernières ramifications correspondent aux portions sécrétrices nommées acini. Droite : trois lobes sont représentés, dont un complet entouré en jaune avec ses lobules. La couleur bleue schématise le tissu conjonctif et les ronds gris le tissu adipeux.

Les structures épithéliales de la glande mammaire correspondent à un épithélium qui est bistratifié et cubo-cylindrique depuis l'origine du canal galactophore jusqu'aux acini. Il repose comme la plupart des épithéliums sur une membrane conjonctive spécialisée : la membrane basale. En regard de la lumière se trouvent les cellules épithéliales dites luminales. Ce sont ces cellules qui remplissent la fonction sécrétoire. Entre les cellules luminales et la membrane basale se trouvent les cellules myoépithéliales (figure 3). Ces dernières ont pour

rôle d'assurer la contraction et possèdent donc dans leur cytoplasme des protéines contractiles. Autour des acini, le tissu conjonctif lâche, dit palléal, est constitué d'une proportion équivalente, de substance fondamentale, de fibres et de cellules (fibroblastes, plasmocytes, lymphocytes et macrophages). Ce tissu se caractérise aussi par la présence de nombreux capillaires (figure 3). Le tissu conjonctif dense qui soutient les lobes contient une prédominance de fibres (collagènes et élastiques) par rapport aux éléments cellulaires et à la substance fondamentale. Dans ce type de tissu les éléments cellulaires sont en majorité des fibroblastes.



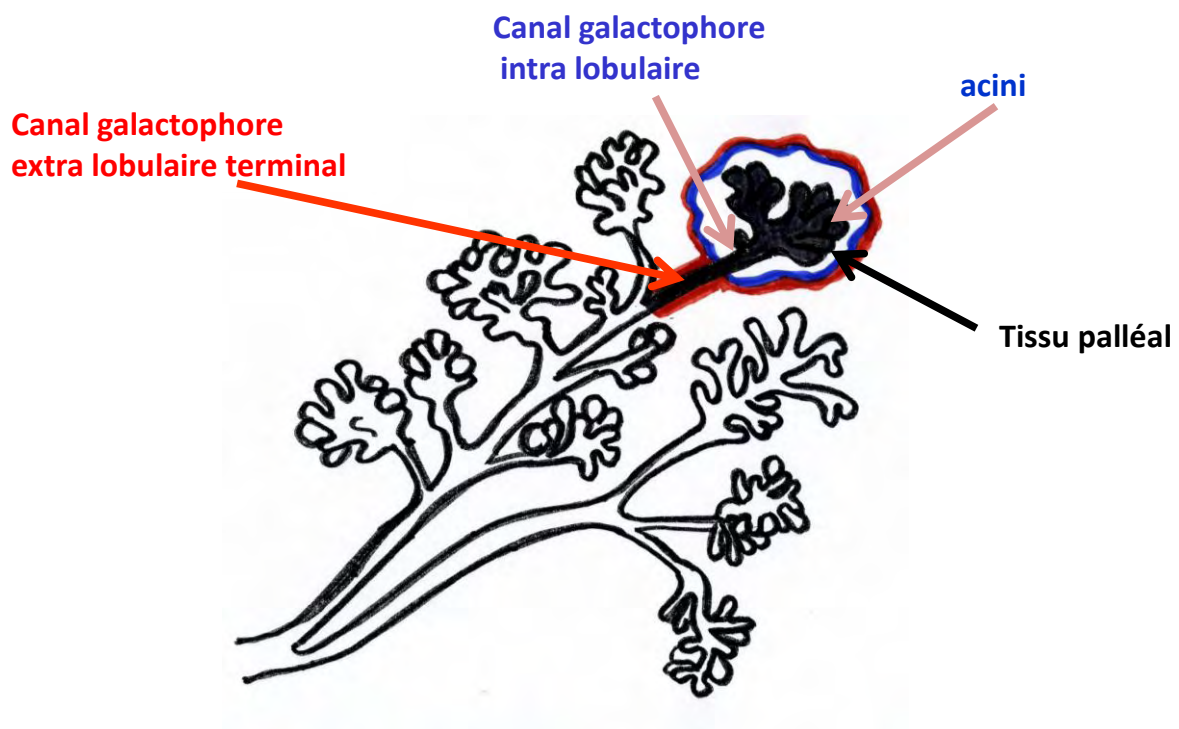
**Figure 3. Représentation schématique des parois des canaux galactophores et des acini :**  
 L'épithélium bi-stratifié mammaire est représenté par des cellules luminales bleu foncé et clair en regard de la lumière et myoépithéliales roses et oranges en regard de la membrane basale. La membrane basale correspond à un trait bleu clair. Dans le tissu conjonctif, les cellules adipeuses sont représentées par des ronds jaunes, les fibroblastes sont allongés orange. Les fibres collagènes correspondent aux traits verts et les capillaires aux ronds rouges. Les lymphocytes sont représentés par des ronds noirs et les macrophages sont violets.

### **3.2-Histologie, cellules souches et carcinogénèse de la glande mammaire**

L'unité terminale ducto-lobulaire (UTLD) a été définie à l'origine comme la partie de l'arbre galactophorique contenant la dernière ramification d'un canal galactophore et le lobule qu'elle dessert (Welling et al, 1975) (figure 4). Depuis, la littérature semble parfois réduire l'UTLD au lobule (Villadsen, 2005 ; McKian et al 2009 ; Joshi et al, 2012 ; Xiaohong et al 2013). L'UTLD est reconnue comme l'unité fonctionnelle de la glande mammaire. C'est à partir de cette unité qu'au moment de la grossesse et de la lactation vont se développer de nouvelles UTLD, de nouveaux lobules et les alvéoles. Il est aussi admis que c'est à partir de cette unité que proviennent la plupart des tumeurs bénignes et malignes de la glande mammaire. Les cellules souches qui permettent le renouvellement des structures sont localisées au niveau de l'assise basale entre les cellules myoépithéliales. Les cellules souches capables de reproduire de nouvelles UTLD se trouvent au niveau des canaux terminaux extra lobulaire (figure 5). Ce sont des cellules multipotentes (progéniteurs précoces) capables de donner naissance aux deux types de cellules : luminales et myoépithéliales. Il existe d'autres cellules progénitrices plus tardives qui vont se trouver au niveau du lobule (figure 5). Cependant ces cellules progénitrices tardives sont plus engagées dans le processus de différenciation et ne pourront renouveler qu'un seul des deux types cellulaires luminal ou myoépithélial, elles sont unipotentes. Les cellules multipotentes des canaux terminaux sont des cellules quiescentes qui ne se mettent en division que lorsque le stock de cellules progénitrices tardives lobulaires est épuisé ou ne suffit pas, par exemple lors de la grossesse et de la lactation. Ces cellules sont donc la plupart du temps hors cycle. Les cellules progénitrices tardives des lobules sont des cellules qui régulent l'homéostasie quotidienne et qui sont donc en cycle et prolifèrent activement (Villadsen et al, 2007; Joshi et al, 2012). En ce qui concerne l'émergence des tumeurs, il est proposé que la transformation des cellules

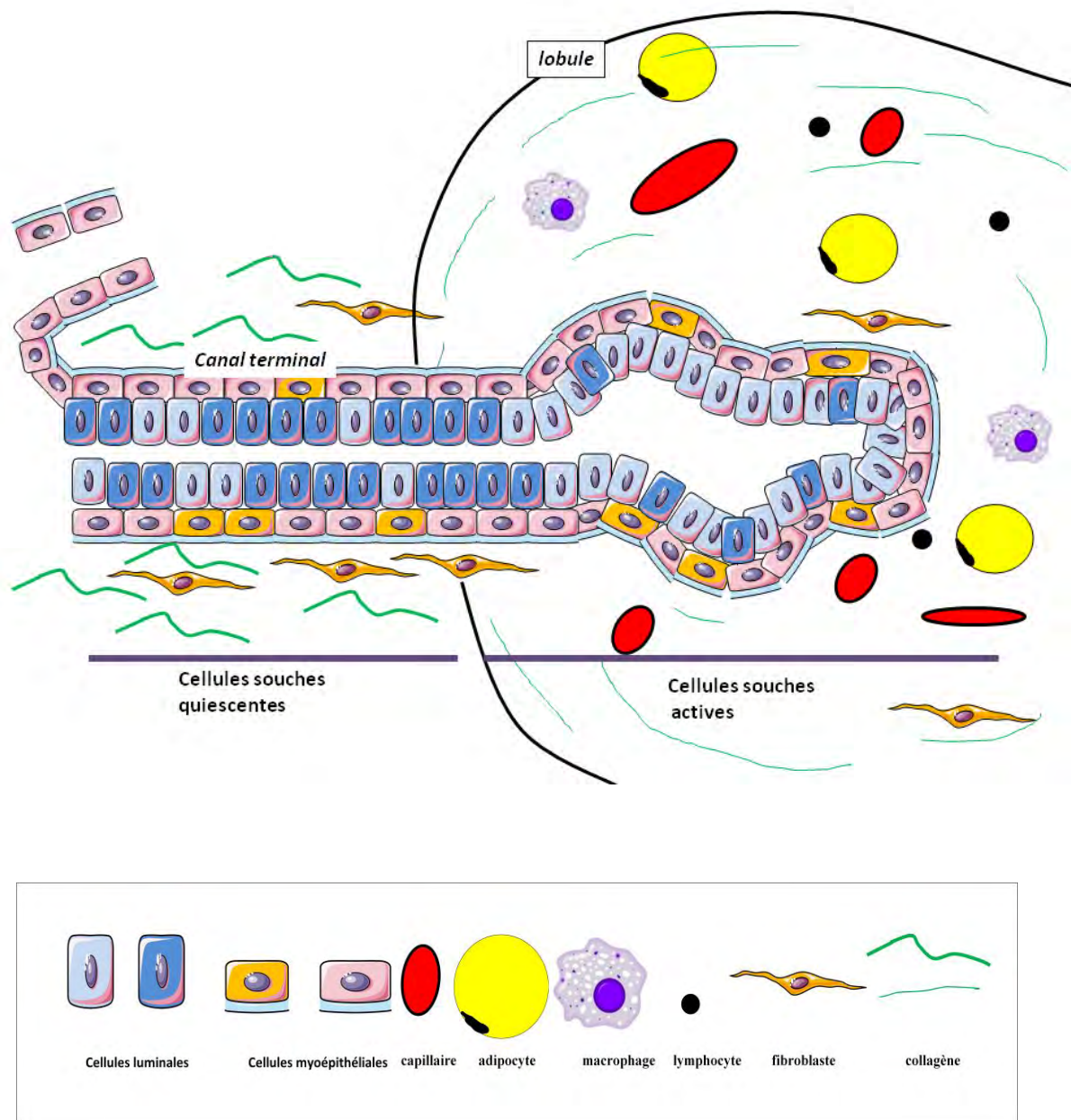
souches précoces ou tardives soit à l'origine des populations tumorales initiales (cellules souches cancéreuses) capables de générer tous les phénotypes carcinomateux que l'on observe dans les cancers mammaires. Certains émettent l'hypothèse par exemple que les cancers ER positifs (ER+) proviendraient de progéniteurs ER+ et les carcinomes ER négatifs (ER-) de progéniteurs ER- (Joshi et al, 2012). Par ailleurs, il a été montré récemment, que le risque de cancer du sein décroît avec l'involution du lobule et plus précisément qu'il était proportionnel au nombre d'acini par lobule et à la taille des lobules (McKian et al 2009).

## Unité terminale ductolobulaire UTLD



**Figure 4 :** L'unité terminale ducto-lobulaire : le lobule est entouré par un trait bleu et l'unité terminale ductolobulaire est entourée par un trait rouge.

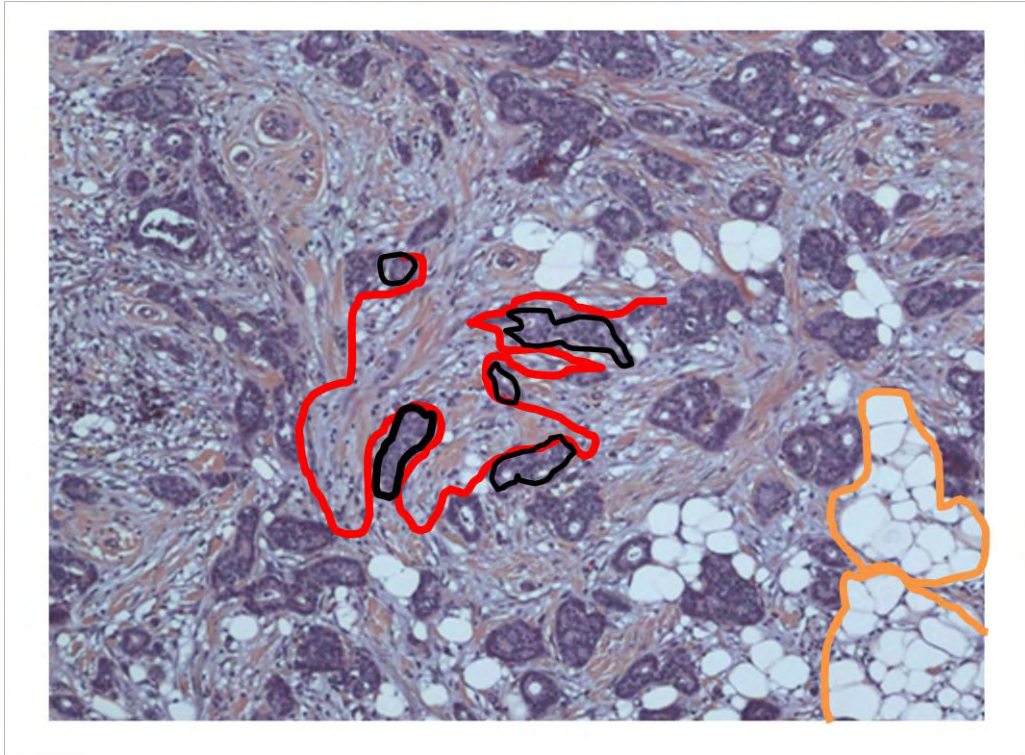




**Figure 5. Représentation schématique de la localisation des cellules souches quiescentes et actives :** Les cellules souches quiescentes sont dans le canal galactophore extra-lobulaire et les cellules souches actives sont dans les structures épithéliales lobulaires (canaux galactophores intra lobulaire et acini)

### 3.3-Anatomie et cytologie pathologiques des tumeurs épithéliales de la glande mammaire, classification

*D'après Lakhani et al, 2012*



**Figure 6 : Photographie, d'une préparation microscopique, d'un adénocarcinome canalaire invasif du sein : Hémalum éosine (HE) grossissement X100.** En violet les structures épithéliales : cinq amas épithéliaux cancéreux ont été entourés en noir. Les structures épithéliales malignes forment des structures de contours arrondis ou anguleux, pleines ou qui possèdent par place une lumière imitant des glandes normales. Le stroma tumoral apparaît orange et gris et il est constitué de fibres, de substance fondamentale et de cellules organisées de façon non cohésive (fibroblastes, cellules immunitaires). Les structures rondes blanches regroupées en amas dont deux sont entourées par un trait orange correspondent à des lobules de tissu adipeux.

### **3.3.1-Types histologiques des cancers du sein**

Le sein est constitué de différents tissus : épithélial, conjonctif, immunitaire, vasculaire qui peuvent tous donner des cancers. On peut donc observer des cancers d'origine épithéliale, mésenchymateuse, ou encore lymphomateuse. Les plus fréquents sont de loin les cancers épithéliaux, les carcinomes, que l'on nomme couramment « cancers du sein ». Dans ce manuscrit et dans l'étude qui suit nous traitons uniquement des cancers du sein épithéliaux. Parmi les nombreux types de cancers épithéliaux, les deux types, les plus fréquents sont les carcinomes invasifs d'aucun type special (NST pour No Special Type), (figure 6) (ou encore appelés carcinome canalaire invasif NOS pour carcinome canalaire Not Otherwise Specified) et les carcinomes lobulaires. Ces cancers peuvent être précédés de lésions précurseurs tels que les carcinomes canaux ou lobulaires in situ. Il existe également des lésions proliférantes telles que les hyperplasies typiques ou atypiques.

Le cancer invasif NST que nous appellerons carcinome canalaire représente 75% des tumeurs mammaires invasives. Ces cancers sont d'aspect très varié. Les cellules carcinomateuses forment des cordons, des ilots, des travées ou présentent une différenciation glandulaire. Les noyaux peuvent être petits, réguliers et uniformes, ou très pléomorphiques avec de nombreux et gros nucléoles. L'activité mitotique peut être minime ou aller jusqu'à 80%. Le tissu conjonctif ainsi que les cellules inflammatoires sont d'abondance variable. Souvent, on observe des foyers de carcinome in situ (CIS c'est-à-dire cancer limité à l'épithélium).

Le carcinome invasif lobulaire représente environ 15% des tumeurs mammaires invasives. Il s'agit d'une prolifération de petites cellules peu cohésives, dispersées dans un tissu conjonctif dense ou rangées en cordons linéaires infiltrants. Les noyaux sont ronds entourés d'une fine couronne cytoplasmique. Les mitoses sont peu fréquentes (Lakhani et al, 2012).

### **3.3.2-Grade**

Les carcinomes invasifs vont être gradés. Le grade se base sur 3 critères : la formation de glandes, le pléomorphisme nucléaire, et le compte mitotique. Un score numérique allant de 1 à 3 est utilisé pour chacun des critères. L'évaluation de la présence de glandes est établie sur l'ensemble de la tumeur analysée alors que l'évaluation du pléomorphisme nucléaire prend en compte la zone où les noyaux sont les plus irréguliers avec les nucléoles les plus proéminents. Pour le compte mitotique, c'est la zone où se trouve la plus forte prolifération qui est prise en compte. Le grade est déterminé par l'addition des trois facteurs les uns avec les autres (tableau 1). Ainsi le grade I, avec un score allant de 3 à 5, correspond à des carcinomes bien différenciés. Le grade II, avec un score de 6 à 7, correspond aux carcinomes moyennement différenciés. Enfin le grade III, avec un score de 8 ou 9, correspond à des carcinomes peu différenciés. En conséquence, le grade I comprend les carcinomes les moins agressifs et de bon pronostic et le grade III comprend les carcinomes les plus agressifs et de mauvais pronostic. Le grade II comprend donc les carcinomes modérément agressifs. Les différents grades histologiques correspondent à des profils génomiques, transcriptomiques et protéomiques distincts. Il existe une corrélation inverse entre le grade des tumeurs et la survie des patients qui présentent un cancer du sein invasif. Le grade est un puissant facteur pronostique et un élément clé concernant les décisions cliniques (Lakhani et al, 2012).

**Tableau 1 Grade des carcinomes mammaires d'après Eltson et Ellis, 1991**

<b>Morphologie</b>	<b>score</b>
Formation de glandes et de tubules	
concerne > 75% de la tumeur	<b>1</b>
concerne 10 - 75% de la tumeur	<b>2</b>
concerne < 10 % de la tumeur	<b>3</b>
<b>Pléomorphisme nucléaire</b>	
Noyau petit, uniforme et régulier	<b>1</b>
Augmentation modérée de la taille et variabilité de leur aspect	<b>2</b>
Variations marquées	<b>3</b>
<b>Compte des mitoses</b>	dépend du diamètre du champ
Pour un champ de 0,60 mm	
≤ 10	<b>1</b>
11 et 20	<b>2</b>
≥ 20	<b>3</b>
<b>Grade final</b>	
<b>Grade I</b>	score total entre 3 et 5
<b>Grade II</b>	score total de 6 ou de 7
<b>Grade III</b>	score total de 8 ou de 9

### **3.3.3-Stade**

C'est le stade TNM publié par l'American Joint Committee sur le Cancer qui est largement reconnu et utilisé. Ce système est basé sur l'extension de la tumeur au niveau de son site primitif (Tumor T), sur l'envahissement des ganglions régionaux (Nodes N) et sur la présence de métastases (M). Cette évaluation est importante pour la prise de décision thérapeutique. En ce qui concerne l'envahissement des ganglions lymphatiques, il s'agit du facteur pronostique individuel le plus important. La métastase ganglionnaire est corrélée à la taille de la tumeur et au nombre de foyers de carcinomes invasifs. Le temps de rémission et la survie globale diminuent avec le nombre de ganglions atteints. La positivité des ganglions lymphatiques est un signe de dissémination de la maladie dans l'organisme bien au delà du sein et du creux axillaire. Le curage ganglionnaire n'est donc pas curatif et aura peu d'effet sur la survie (Lakhani et al, 2012).

### **3.3.4-Tests moléculaires mettant en évidence le récepteur aux œstrogènes, le récepteur à la progestérone et l'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2**

Trois marqueurs biologiques sont recherchés en pratique courante pour la prise en charge des patients avec un cancer du sein invasif : ER $\alpha$ , le récepteur à la progestérone (PR) et l'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2). Ils sont tous les trois des cibles ou des indicateurs pour des thérapies efficaces dans ce cancer.

### **Évaluation de la présence d'ER $\alpha$**

Actuellement, seul ER $\alpha$  est détecté en routine par immunohistochimie (IHC). Cette méthode est spécifique et sensible. De plus, elle présente l'avantage de pouvoir s'effectuer sur des prélèvements inclus en paraffine. Dans les carcinomes invasifs, dits positifs pour le récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ +), la proportion de cellules carcinomateuses marquées varie de 1% à 100%. Cliniquement, une tumeur est considérée ER $\alpha$ + dès que  $\geq 1\%$  des cellules carcinomateuses sont marquées (Harvey et al, 1999). On observera en microscopie optique un marquage du noyau des cellules carcinomateuses. Les autres cellules présentes dans ou autour de la tumeur tels que les fibroblastes, adipocytes, lymphocytes ne sont pas marquées. Le ER $\alpha$  est un facteur pronostique thérapeutique incontournable puisque seuls les carcinomes ER $\alpha$ + vont répondre aux thérapeutiques anti-œstrogènes (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative group, 2005 ; Schiff et al, 2010). De plus, il y a une relation directe entre la réponse à l'hormonothérapie et le pourcentage de cellules positives pour ER $\alpha$  dans une tumeur. Enfin, même les tumeurs qui présentent un pourcentage très faible de cellules ER $\alpha$ + montrent un bénéfice pour ces thérapeutiques en comparaison avec les tumeurs complètement négatives (Harvey et al, 1999).

### **Évaluation de la présence de PR**

Le PR est lui aussi évalué en routine par un examen IHC. Etant régulé par le ER $\alpha$  sa présence témoigne le plus souvent d'un ER $\alpha$  fonctionnel (Clarke, 2003). Le PR est exprimé dans 60 à 70 % des cancers du sein. Dans les carcinomes, la proportion de cellules carcinomateuses positives varie de 1% à 100%. On observera en microscopie optique un marquage du noyau des cellules carcinomateuses. Les autres cellules présentes dans ou autour de la tumeur tels que les fibroblastes, adipocytes, lymphocytes ne sont pas marquées. Là aussi il y a une corrélation directe entre le niveau d'expression du PR et la réponse aux traitements

hormonaux. Malgré le fait que l'expression du PR dépend de celle d'ER $\alpha$ , ils ne sont pas toujours exprimés simultanément dans les carcinomes. Quatre combinaisons sont donc observables : le phénotype [ER $\alpha$ +, PR+] est le plus fréquent (70%) et est associé avec la meilleure réponse thérapeutique ; les carcinomes négatifs pour ER $\alpha$  et PR [ER $\alpha$ -, PR-] représentent 25% des tumeurs et ne répondent pas aux thérapeutiques hormonales. Les deux autres phénotypes [ER+, PR-] et [ER-, PR+] montrent des réponses intermédiaires (Lakhani et al, 2012).

### **Évaluation de la présence de HER2**

Le gène *HER2* est localisé sur le chromosome 17 et il code pour un récepteur à tyrosine kinase transmembranaire. Le gène est amplifié dans 15% des carcinomes primitifs invasifs du sein et cette amplification est corrélée avec une augmentation de l'expression de la protéine. L'état de HER2 est évalué par immunohistochimie et par FISH (Fluorescent Hybridation in Situ). Les cancers positifs pour HER2 vont répondre positivement à des thérapies qui le ciblent spécifiquement tels que l'anticorps monoclonal anti-HER2, le trastuzumab et l'inhibiteur de thyrosine kinase, le lapatinib (Epstein, 2010 ; Baselga et al, 2012).

### **Étude de signatures génétiques**

Des études se développent basées sur des techniques de microarray afin de déterminer des groupes d'expression de gènes qui seraient de bon ou de mauvais pronostic ou de bon et de mauvais répondeur à la thérapeutique (Jansen et al, 2005 ; Buyse M et al, 2006).



## **4-Thérapeutiques des carcinomes mammaires**

L'ablation chirurgicale de la tumeur demeure aujourd'hui encore la première étape du traitement des carcinomes du sein et peut s'accompagner d'un curage ganglionnaire. De plus, un traitement par radiothérapie est souvent associé afin de diminuer les récurrences locorégionales (Pierce et al, 2005). En fonction de l'extension du carcinome, de son type et de son grade, seront également associés de l'hormonothérapie, des chimiothérapies et des traitements spécifiques contre de nouvelles cibles. L'objectif de cette première partie du travail étant principalement de présenter les implications moléculaires d'ER dans la pathologie carcinomateuse de la glande mammaire, les traitements anti hormonaux seront développés, les traitements spécifiques anti- récepteurs de facteur de croissance seront cités mais les traitements cytotoxiques ne seront pas traités.

### **4.1-Une nouvelle classification consensus pour la prise en charge thérapeutique**

Dans l'évolution actuelle de la prise en charge des cancers du sein qui tend à établir une cartographie moléculaire individuelle de chaque cancer afin de pouvoir les traiter plus spécifiquement et donc plus efficacement, une nouvelle classification a été mise en place. Les carcinomes invasifs du sein sont des tumeurs qui présentent une grande hétérogénéité et cette nouvelle classification consensus (St Gallen, 2011) prend mieux en compte les différences notamment moléculaires qui existent entre les différents adénocarcinomes et qui nécessitent des thérapies plus ciblées (tableau 2).

Tableau 2. Consensus St Gallen, recommandation pour les traitements systémiques

Sous type	Définition	Traitement
Luminal A	RH+/HER2 -/ Ki67 faible	Thérapie endocrine seule
Luminal B	RH+/HER2-/Ki67 élevé	Thérapie endocrine+/- cytotoxiques
Luminal B	RH+/HER2+	Cytotoxiques+anti-HER2+ thérapie hormonale
Her-2positif	RH-/HER2 +	Cytotoxiques + anti-HER2
Triple négatif	RH-/HER2-	Cytotoxiques

### Thérapeutiques anti-œstrogènes dans le cancer du sein

Deux approches anti-hormonales sont utilisées pour inhiber la signalisation du ER :  
L'inhibition de la liaison des œstrogènes au ER par des antagonistes ou l'inhibition de la  
synthèse des œstrogènes par exemple avec les inhibiteurs d'aromatase.

#### 4.2-Les antagonistes des œstrogènes

##### Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)

Les œstrogènes agissent dans la cellule en se liant aux ER $\alpha$ . Les SERMs tels que le Tamoxifène et le Raloxifène sont des molécules capables de se lier aux ER $\alpha$  et d'entrer en compétition avec les œstrogènes. Ainsi dans la glande mammaire, pour ces deux molécules et dans l'utérus pour le Raloxifène, ils auront une activité antagoniste. Par contre, dans l'utérus pour le Tamoxifène, le système cardiovasculaire et l'os pour les deux molécules, ils auront une activité agoniste. Ces molécules sont donc des antagonistes partiels (Renoir, 2012).

En raison de son activité antagoniste sur l'ER $\alpha$  dans la glande mammaire, le Tamoxifène est utilisé depuis plus de 30 ans dans le traitement des carcinomes mammaires (Early Breast Cancer, 1998). Dans le traitement des cancers du sein précoces, ER+, il est proposé en tant qu'adjuvant thérapeutique après la chirurgie. Un traitement de 5 ans par le Tamoxifène permet de diminuer les récurrences et améliore la survie indépendamment de l'âge du patient et du stade ganglionnaire (Come et al, 2003). Les données les plus récentes montrent que les femmes avec un cancer ER+ qui continuent le Tamoxifène pendant 10 ans au lieu de 5 ont une réduction encore plus grande des risques et plus particulièrement au-delà de 10 ans (Davies et al, Lancet 2013). Son bénéfice est présent seul ou en association avec une chimiothérapie. Il est aussi prescrit chez les patientes avec des cancers du sein métastatiques ER+ où il aura un effet bénéfique dans 50% des cas (Osborne et al, 1998). Cependant il n'améliore pas le pronostic des patientes porteuses d'un cancer du sein ER-. Par ailleurs, l'utilisation du Tamoxifène en thérapeutique préventive ou dans les CIS donne aussi des résultats prometteurs (Schwartz et al, 2001). De plus, grâce à sa fonction agoniste, ce traitement va permettre un maintien de la densité osseuse chez la femme ménopausée. Cependant elle sera aussi à l'origine de l'apparition d'effets secondaires avec des risques thrombo-emboliques et de cancers de l'endomètre (Pearce et al, 2004). Enfin, une utilisation prolongée peut être à l'origine de résistances.

### **Selective Estrogen Down Régulators (SERD)**

Ce sont l'ICI 164 384, et l'ICI 182 780 ou Fulvestrant et le RU58668. Ce sont des antagonistes purs des oestrogènes (Wakeling et al, 1992). Ils sont dépourvus d'activité agoniste quelque soit l'organe considéré. Ils se lient à ER $\alpha$  avec une affinité 100 fois supérieure à celle du Tamoxifène inhibant sa dimérisation et sa signalisation. Le ER $\alpha$  sera ensuite relocalisé à la matrice nucléaire ce qui entraînera sa dégradation rapide par le

protéasome. Leur indication concerne les cancers avancés et ou résistants au Tamoxifène (Robertson et al, 2003). Ces molécules ne franchissent pas la barrière hémato-encéphalique, et semblent sans effet sur l'os et les lipides. En ce qui concerne ER $\beta$ , contrairement à ER $\alpha$ , il reste stable lorsqu'il se lie aux SERD. D'où le nom de SERD pour ces traitements (Renoir 2012).

### **4.3-Inhibition des œstrogènes**

#### **Suppression de la fonction ovarienne**

Chez la femme pré-ménopausée, dans le but de supprimer la fonction ovarienne, différentes thérapeutiques peuvent être proposées. Les agonistes de l'hormone de relargage de l'hormone lutéinisante (LHRH) comme la Goséréline (Limonta et al 2001), ou l'ablation des ovaires, ou encore la Progestine.

#### **Les inhibiteurs d'aromatases**

Chez la femme ménopausée, étant donné que les ovaires ne sont plus les producteurs principaux d'œstrogènes et que ce sont les tissus périphériques comme par exemple le tissu adipeux qui les produisent, les supprimeurs de la fonction ovarienne n'ont bien entendu plus d'utilité. En revanche, les anti-aromatases (Létrozole, Anastrozole, Exémestane) sont très souvent prescrits en première intention chez la femme post- ménopausée avec un carcinome RE+ car ils réduisent la synthèse d'œstrogènes au niveau périphérique et intra-tumoral. Ils ciblent l'enzyme qui catalyse la dernière étape de biosynthèse des œstrogènes à partir des androgènes : l'aromatase (Strasser-Weipplet et al, 2005). Chez ces femmes, ils diminuent le niveau des œstrogènes sous le seuil de détection et ils sont considérés comme plus actifs que le Tamoxifène en première ligne de thérapeutique. De plus, ils présentent moins d'effets secondaires de type cancer endométrial ou complications thrombo-emboliques que le

Tamoxifène (Santen et al, 2003). Ils sont par contre à l'origine d'une perte osseuse importante. Chez la femme pré-ménopausée ils montrent les mêmes résultats que le Tamoxifène ou l'ablation des ovaires.

Tous ces traitements sont indiqués dans les cancers ER+ mais ils n'ont pas d'effet dans les cancers RE négatifs qui représentent pourtant 20-30% des cancers du sein et qui de surcroît ont un mauvais pronostic. Il est donc impératif d'explorer des nouvelles voies de signalisation permettant de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques qui peuvent jouer un rôle dans ces cancers ER négatifs. Les rétinoïdes, les récepteurs à thyrosine kinases, le récepteur des facteurs de croissance épidermiques (EGFR), les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (cox-2) sont quelques exemples de ces nouvelles cibles thérapeutiques. (Pour revue Renoir et al 2012). Un exemple de ces thérapeutiques ciblées couramment utilisées concerne les traitements anti-récepteurs à tyrosine kinase. Un quart des cancers du sein sur-exprime HER2. HER2 est un membre de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase. Cette famille comprend également le récepteur des facteurs de croissance épidermique (EGFR). L'hyperactivité de ces récepteurs est à l'origine d'une activation de la prolifération cellulaire et de la survie. Trastumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal humanisé qui bloque le domaine extracellulaire du récepteur HER2. Il est indiqué dans les cancers du sein précoces ou dans les cancers métastatiques seulement chez les patients qui surexpriment ou qui présentent une amplification génique de *HER2* (15% des patients) (Emens, 2005). D'autres inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase sont en cours d'évaluation tel que le Lapatinib qui bloque à la fois l'EGFR et HER2 (Cazzaniga, Bonanni, 2012).

Nous venons de voir que les oestrogènes et leurs récepteurs sont impliqués dans les étapes de cancérisation mammaire. Nous allons maintenant aborder leur structure et leurs rôles.

## **II- Les œstrogènes et les récepteurs aux œstrogènes**

### **1- Les œstrogènes**

#### **Définition et rôles**

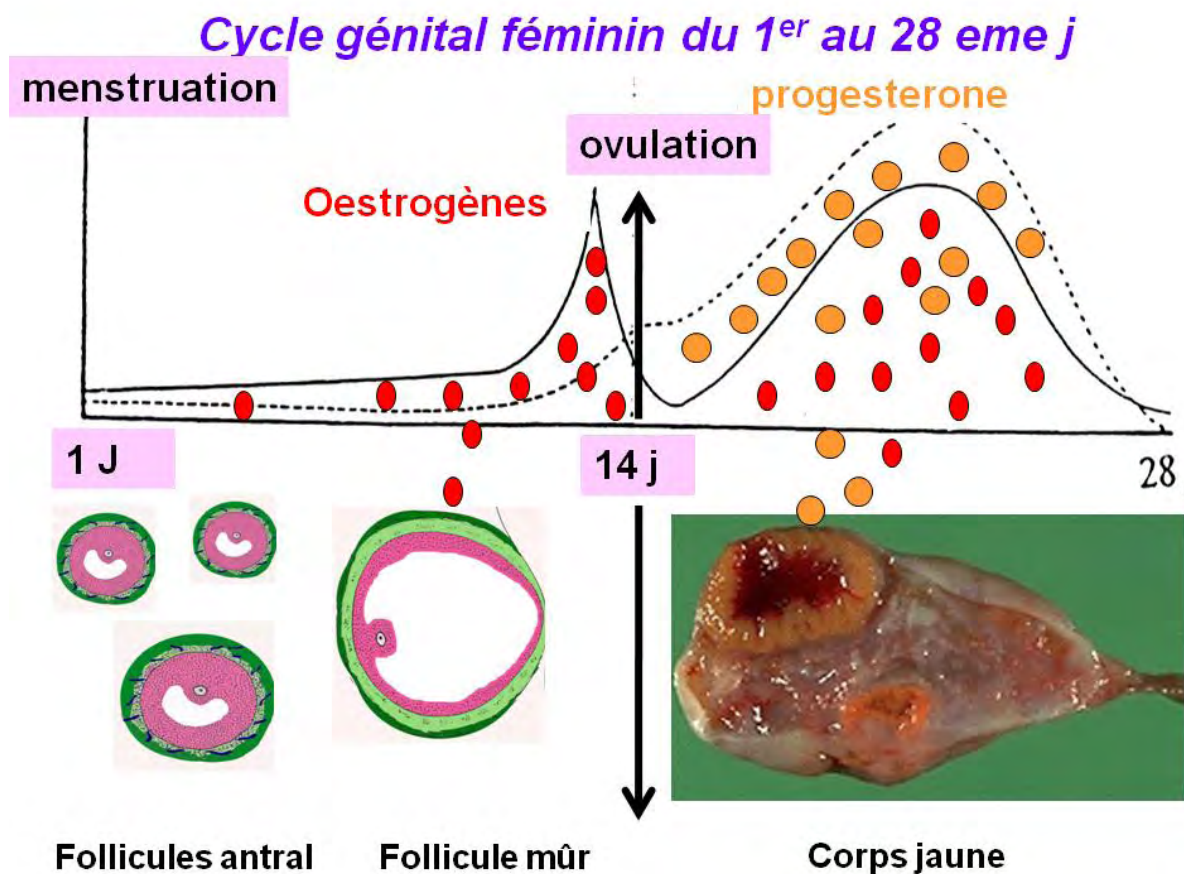
Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes qui régulent le développement et la physiologie du système de reproduction et de la glande mammaire par l'intermédiaire des ER. Ce sont des morphogènes c'est-à-dire qu'ils sont indispensables au développement de certains organes. En ce qui concerne le développement de la glande mammaire, les œstrogènes sont le principal moteur de régulation de la croissance et des ramifications des canaux et des acini (Briskin et al, 2006 ; Belet et al, 2010). Ils interviennent aussi dans le développement d'autres tissus tels que l'os, le système cardiovasculaire, le cerveau et le système immunitaire. En ce qui concerne l'os, ils jouent un rôle dans sa croissance et dans son renouvellement (Manolagas, 2000). Les œstrogènes ont un effet pro-apoptotique sur les ostéoclastes et anti-apoptotique sur les ostéoblastes (Manolagas et al, 2002). Dans le système cardio-vasculaire, les œstrogènes montrent un effet athéroprotecteur (Hodis et al, 2001). Enfin, pour le cerveau, les études épidémiologiques sont en faveur d'un rôle protecteur des œstrogènes contre la maladie d'Alzheimer. Plus récemment, il a aussi été montré que les femmes seraient protégées des infections par l'inhibition de la caspase 12 via la signalisation des œstrogènes (Yeretssian et al, 2009).

#### **Structure et synthèse**

Ce sont des dérivés du cholestérol qui possèdent un squelette carboné à 18 atomes de carbone et un cycle A aromatique porteur d'une fonction phénolique. L'œstrogène le plus puissant est le 17 $\beta$  œstradiol (E2). Il existe trois métabolites d'E2, l'oestrone (E1), l'oestriol

(E3), et l'oestrol (E4). E3 et E4 ne sont produits qu'au cours de la grossesse, E3 par le placenta et E4 par le foie du fœtus. E1 est synthétisé en quantité beaucoup moins importante que E2 et malgré une forte affinité pour les ER, il reste un agoniste de plus faible affinité que E2 (Heldring et al, 2007). Chez la femme, en période d'activité génitale, E2 et E1 sont synthétisés principalement par les ovaires et pendant la grossesse par le placenta.

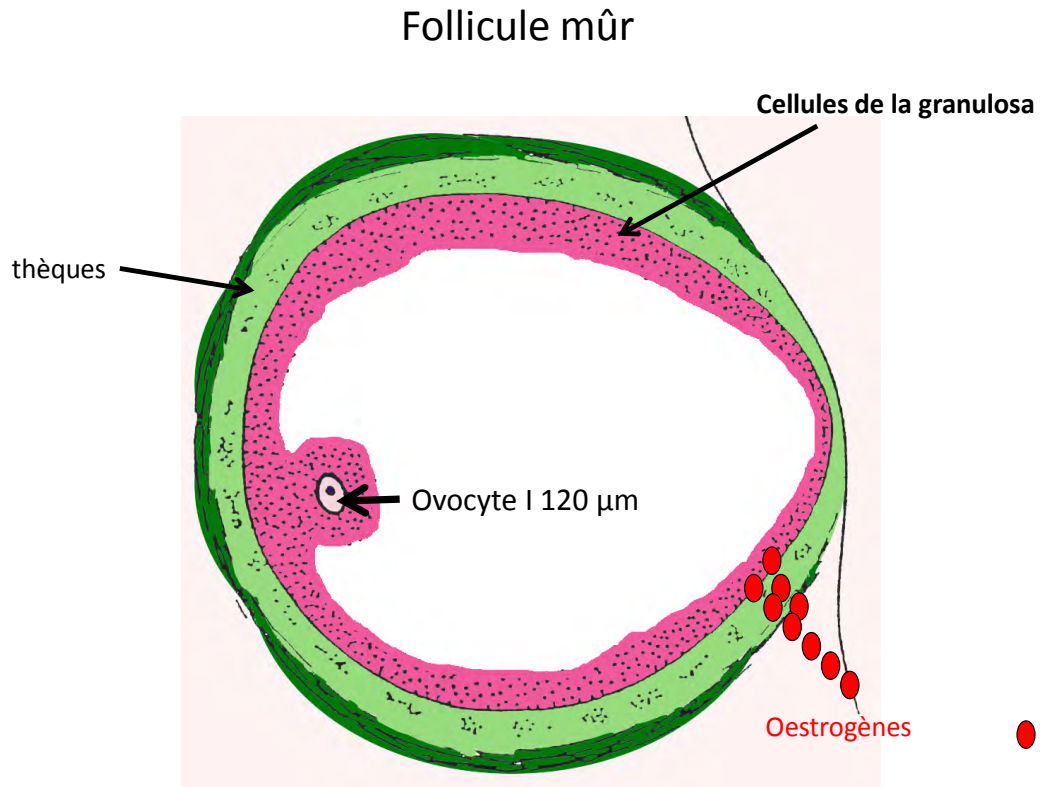
Pendant la période d'activité génitale, la femme est soumise à une synthèse cyclique d'oestrogènes et de progestérone qui détermine le cycle génital féminin avec une période de 28 jours en moyenne (figure 7). Au début d'un cycle génital de 28 jours, il reste 4 à 5 follicules qui n'ont pas dégénéré et qui sont arrivés au stade de maturation dit antral. On les appelle donc les follicules antraux. Parmi eux, un seul sera recruté pendant la deuxième semaine du cycle. Ce follicule recruté qui sera capable d'ovuler c'est-à-dire d'expulser son ovule hors de l'ovaire se nomme le follicule mûr. C'est lui qui est responsable de l'importante synthèse d'oestrogènes qui précède l'ovulation. Après l'ovulation, le follicule se transforme en corps jaune qui sera à son tour responsable de la synthèse en grande quantité de progestérone et d'oestrogènes jusqu'à sa dégénération en fin de cycle qui s'accompagnera d'une chute importante et rapide du taux plasmatique des hormones.



**Figure 7. Cycle génital féminin : relation structure ovarienne et fonction.** En haut : les courbes représentant le taux plasmatique des œstrogènes (trait plein) et de la progestérone (trait pointillé). En Bas : structures ovariennes responsables de la synthèse des hormones.

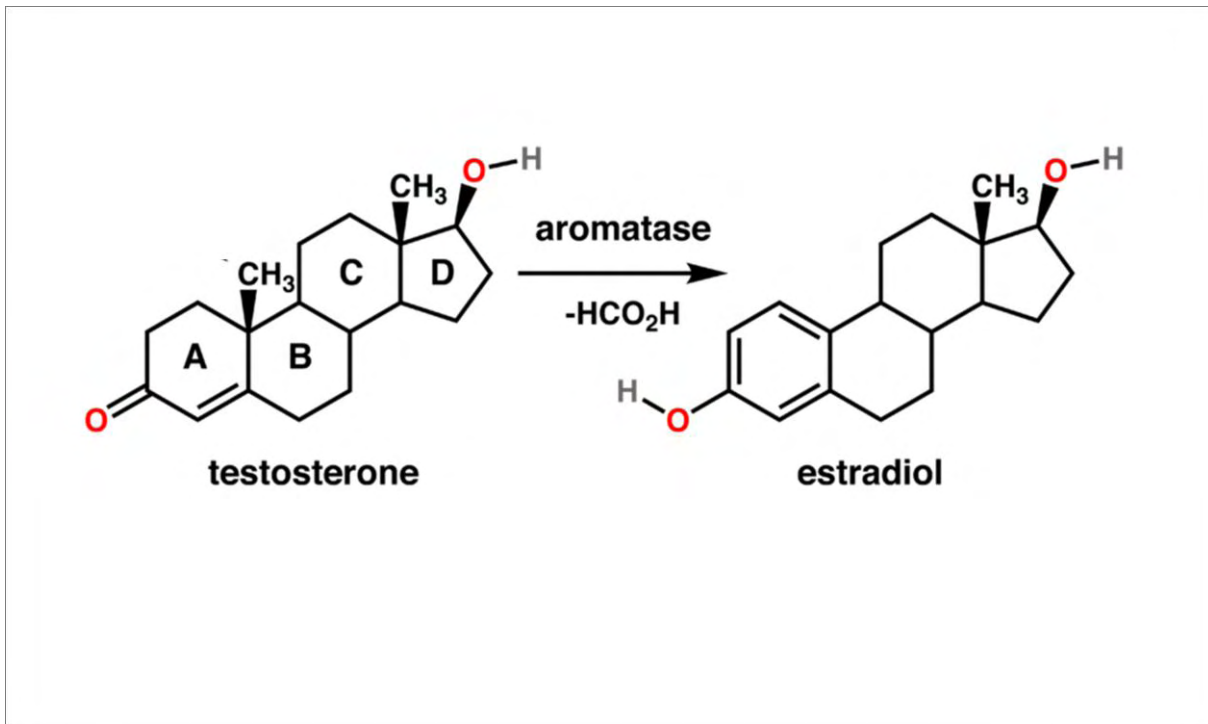
Les follicules représentent ainsi l'unité fonctionnelle de l'ovaire permettant la maturation des gamètes et la production d'hormones stéroïdes. Le follicule mûr représente le stade le plus avancé de la maturation folliculaire. Il a une forme arrondie, est constitué à l'extérieur par des thèques composées de cellules conjonctives et à l'intérieur par plusieurs couches de cellules épithéliales qui entourent l'ovocyte I : les cellules de la granulosa (figure8).





**Figure 8. Follicule mûr juste avant l'ovulation** : En vert foncé et clair les thèques, en rose la granulosa. Au centre de la granulosa, excentré dans le follicule, l'ovocyte I. La production d'oestrogènes, très importante à ce stade, est représentée par des ronds rouges.

Les cellules de la thèque interne produisent des androgènes. Les cellules de la granulosa transforment les androgènes produits par la thèque interne en œstrogènes grâce à une aromatase (figure 9).



**Figure 9. Représentation de la structure moléculaire cyclique de la testostérone et du 17 $\beta$  œstradiol. La conversion de la testostérone en œstradiol se fait grâce à une aromatase.**

Pendant la phase folliculaire du cycle menstruel c'est-à-dire pendant les 14 premiers jours avant l'ovulation ce sont donc les cellules de la granulosa qui sécrètent les œstrogènes. Après l'ovulation, lors de la transformation du follicule en corps jaune, ces cellules se transforment en cellules dites lutéales avec un changement morphologique et notamment une augmentation de leur taille et une accumulation de cholestérol. Ce sont elles qui à leur tour vont produire les œstrogènes et la progestérone pendant la phase lutéale du cycle menstruel du 14<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour et en quantité beaucoup plus importante grâce à leur changement morphologique et donc fonctionnel (Gilks et al, 2012).

Les autres sites de production d'E2 et E1 sont le cortex surrénalien, le tissu adipeux, l'os, l'endothélium vasculaire, le muscle lisse aortique et le cerveau (Gruber et al, 2002). Chez l'homme il existe une faible production d'œstrogènes provenant de l'aromatation périphérique des androgènes surrénaliens et testiculaires.

Les autres ligands du ER tels que les phyto-œstrogènes et les SERM ont été traités dans les chapitres sur l'épidémiologie et les traitements des cancers du sein. Nous ne les développerons donc pas dans ce chapitre.

## **2- Les récepteurs aux œstrogènes (ERs)**

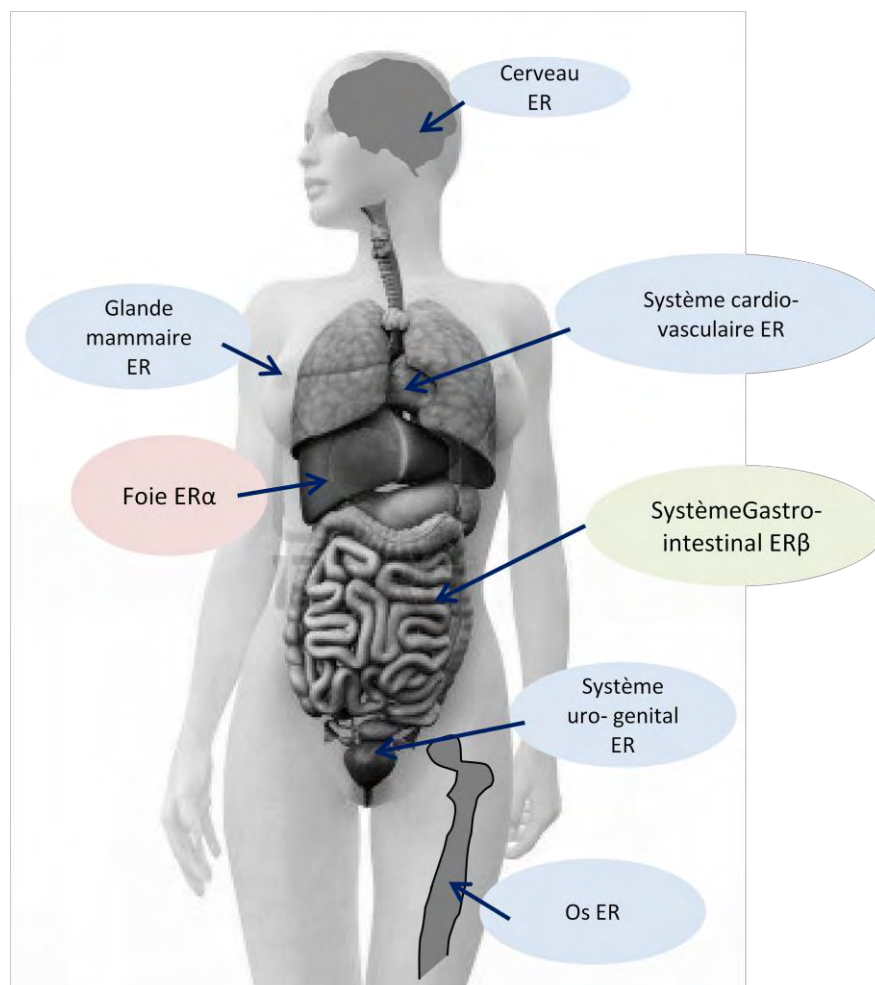
Les ERs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, facteurs de transcription dépendant d'un ligand pour la régulation de l'expression de gènes qui contribuent à la croissance, à la différenciation et au métabolisme. Les autres membres de cette famille comprennent : le récepteur aux hormones thyroïdiennes, le récepteur de la vitamine D, le récepteur de l'acide rétinoïque, et les autres récepteurs stéroïdes comme le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur aux androgènes, le récepteur à la progestérone, et le récepteur aux minéralocorticoïdes.

### **2.1-Caractérisation et localisation des ERs**

L'ER $\alpha$  a été caractérisé en 1950 par Elwood Jensen comme une protéine liant les œstrogènes. A la fin des années 1980, il a été cloné à partir de cellules MCF7 provenant d'une lignée humaine de cancers du sein (Green et al, 1986). Dix ans plus tard, le récepteur aux œstrogènes  $\beta$  (ER $\beta$ ) a été cloné à partir d'une prostate de rat (Kuiper et al, 1996). Les ER sont synthétisés par des gènes distincts : le gène d'ER $\alpha$  se trouve sur le chromosome 6 et le gène d'ER $\beta$  se trouve sur le chromosome 14 (Enmark et al, 1997).

La distribution des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$ , déterminée par RT-qPCR, Northern Blot, hybridation in situ et immunohistochimie, montre une expression de ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans

différents organes chez l'homme et la femme : le sein, le cerveau, le système cardiovasculaire, le tractus urogénital et l'os. En ce qui concerne le système digestif, dans le foie c'est ER $\alpha$  qui est exprimé alors que dans le colon c'est ER $\beta$ . ER $\alpha$  et ER $\beta$  peuvent aussi se localiser dans différents tissus ou types cellulaires au sein d'un même organe. Par exemple dans l'ovaire ER $\beta$  prédomine dans les cellules de la granulosa et ER $\alpha$  prédomine dans les cellules des thèques et du stroma. Dans la prostate, ER $\beta$  est localisé au niveau de l'épithélium alors qu'ER $\alpha$  se trouve dans le stroma (figure 10) (Pearce et al, 2004).



**Figure 10 : représentation simplifiée de la répartition des récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  dans le corps (d'après Pearce et al, 2004)**

## **2. 2-Rôle des ERs dans la fonction et le développement des organes et plus particulièrement de la glande mammaire**

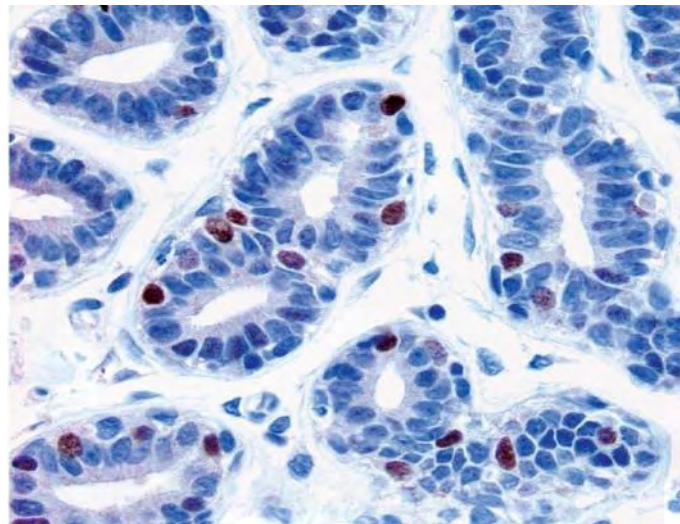
Il a été montré que les deux ER agissent de manière distincte et non redondante dans les systèmes immunitaires, squelettiques, cardiovasculaires et nerveux central (Couse et al, 1999 ; Pearce et al, 2004 ; Heldring et al, 2007). Par ailleurs, l'étude des souris knockout (KO) pour un des ER ou les deux a montré que ces récepteurs n'étaient pas indispensables à la viabilité des souris mâles et femelles et qu'aucun phénotype externe anormal n'était décelable (Lubahn et al, 1993 ; Krege et al, 1998). Cependant les ER sont des facteurs morphogènes importants pour l'utérus, l'ovaire, la glande mammaire, la prostate, et le cerveau (Heldring et al, 2007). En ce qui concerne les organes nécessaires à la reproduction nous citerons quelques exemples d'anomalies morphologiques et fonctionnelles liées à des KO de ER $\alpha$  et/ou de ER $\beta$  et nous développerons plus en détail les anomalies de la glande mammaire. Par exemple, chez la souris mâle, la perte d'ER $\alpha$  est à l'origine d'un trouble de la fertilité en raison d'une diminution du nombre de spermatozoïdes et d'une diminution de leur mobilité. Le KO de ER $\beta$  (KOER $\beta$ ) est à l'origine d'une hyperplasie des canaux de la prostate, conséquence d'une prolifération accrue. Chez la souris femelle le KO de ER $\alpha$  (KOER $\alpha$ ) est à l'origine d'un utérus hypoplasique, d'ovaires kystiques avec des follicules hémorragiques et il n'y a pas de corps jaune et peu de cellules de la granulosa. Le système nerveux central est aussi touché avec une inhibition du comportement sexuel. En conséquence, les souris femelles KOER $\alpha$  sont infertiles (Lubahn et al, 1993). En ce qui concerne le KOER $\beta$ , l'ovaire est aussi affecté, avec un nombre plus important de follicules atrétiques c'est-à-dire de follicules en voie de dégénérescence et moins de corps jaunes que chez la souris sauvage (Krege et al, 1998). Cependant, l'utérus et le comportement sexuel sont normaux. Les souris KOER $\beta$  sont donc un peu moins fertiles que les souris sauvages mais sont quand même capables de se reproduire. Les souris femelles KO pour les deux récepteurs (KOER $\alpha\beta$ ) présentent un développement

initial normal du tractus reproducteur (utérus, vagin) puis vers 2,5 mois on observera une hypoplasie utérine. En ce qui concerne l'ovaire, il y a chez la souris KOER $\alpha\beta$  une transformation progressive de la gonade féminine en une gonade de type masculine avec l'apparition de tubes séminifères (Couse et al, 1999a ; Ogawa et al, 2000).

En ce qui concerne la glande mammaire, ER $\alpha$  en est le principal acteur. Chez la souris femelle KOER $\alpha$  la glande mammaire reste dans un état pré-pubertaire avec des glandes rudimentaires qui ne pourront pas se développer même pendant la grossesse où le taux d'œstrogènes est très élevé (Bocchinfuso et al, 1997 ; Mallepell et al, 2006). Le développement des canaux dans la glande mammaire étant entièrement dépendant d'ER $\alpha$ , ils ne se développeront pas chez ces souris. Cependant, la croissance des acini/alvéoles ne nécessite pas la présence de ER $\alpha$  ni celle de l'Epidermal Growth Factor (EGF) (Wiesen et al, 1999). Cependant, elle dépend quand même de la présence des œstrogènes ce qui suggère qu'ER $\beta$  soit impliqué dans l'alvéologénèse et dans la différenciation des cellules épithéliales. Cette hypothèse corrobore l'observation d'une différenciation incomplète de l'épithélium mammaire chez les souris KOER $\beta$  (Forster et al, 2002). De plus, chez ces souris, les canaux sont d'abord normaux mais alors qu'elles vieillissent l'épithélium va continuer de proliférer et la glande va devenir plurikystique. De surcroît, la prolifération épithéliale chez la souris KOER $\beta$  se poursuit chez les souris âgées de 2 ans alors qu'à cet âge il n'y a plus de follicules dans les ovaires et donc peu d'œstrogènes synthétisés (Heldring et al, 2007). En ce qui concerne la glande mammaire, l'ER $\beta$  semble donc être dans la glande mammaire un répresseur de la fonction proliférative d'ER $\alpha$ . En conclusion, de façon générale, l'ER $\alpha$  stimule la prolifération alors que l'ER $\beta$  a un rôle antiprolifératif (Shim et al, 2003).

### **2.3-Rôle des ERs dans le développement des lésions carcinomateuses de la glande mammaire**

L'expression de l'ER $\alpha$  est de l'ordre de 10% à 20% au niveau des cellules épithéliales luminales lobulaires dans les tissus sains (Khan et al, 1998) (figure 11). Il est important de noter que les cellules épithéliales qui expriment ER $\alpha$  dans la glande mammaire normale chez la femme ainsi que chez la souris femelle ne sont pas les cellules qui prolifèrent. Cependant, cette propriété se perd lorsque les cellules deviennent cancéreuses. En effet, dans le cas des cellules cancéreuses celles qui prolifèrent vont aussi exprimer ER $\alpha$ .



**Collins LC et al, 2007**

**Figure 11 : Expression d'ER $\alpha$  dans la glande mammaire** : Photographie d'un lobule non tumoral et au repos de la glande mammaire au grossissement x400. Le tissu a été traité par immunohistochimie avec un anticorps anti-ER $\alpha$  (1D5, Dako) révélé en brun par la diaminobenzidine (DAB).

Dans les lésions d'hyperplasie, l'expression de l'ER $\alpha$  augmente en particulier lorsqu'elles sont associées à des atypies (Roger et al, 2000). Elle augmente aussi dans le CIS de bas grade. Cette augmentation d'ER $\alpha$  est à l'origine d'une plus grande sensibilité aux œstrogènes et d'un plus grand risque de développer un cancer (Osborne et al, 1998). Au

contraire d'ER $\alpha$ , l'expression d'ER $\beta$  est plus faible dans le CIS de bas grade que dans l'hyperplasie. Cependant, l'expression des deux ER diminue voire disparaît dans le CIS de haut grade (Roger et al, 2001). Dans les carcinomes invasifs, ER $\alpha$  est exprimé dans 50 à 80% des cas et l'expression d'ER $\beta$  est diminuée par rapport au tissu normal (Palmieri et al, 2002). D'ailleurs, dans les lignées de cancers du sein le KOER $\beta$  est à l'origine, comme dans les tissus sains, d'une augmentation de la prolifération cellulaire qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la cycline A2 et une diminution de l'expression de p21/WAF (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) (Treeck et al, 2010). Il est donc proposé chez l'homme comme chez la souris que ER $\beta$  puisse jouer un rôle protecteur dans les tumeurs du sein en inhibant la prolifération et aussi l'invasion (Behrens et al, 2007 ; Williams et al, 2008).

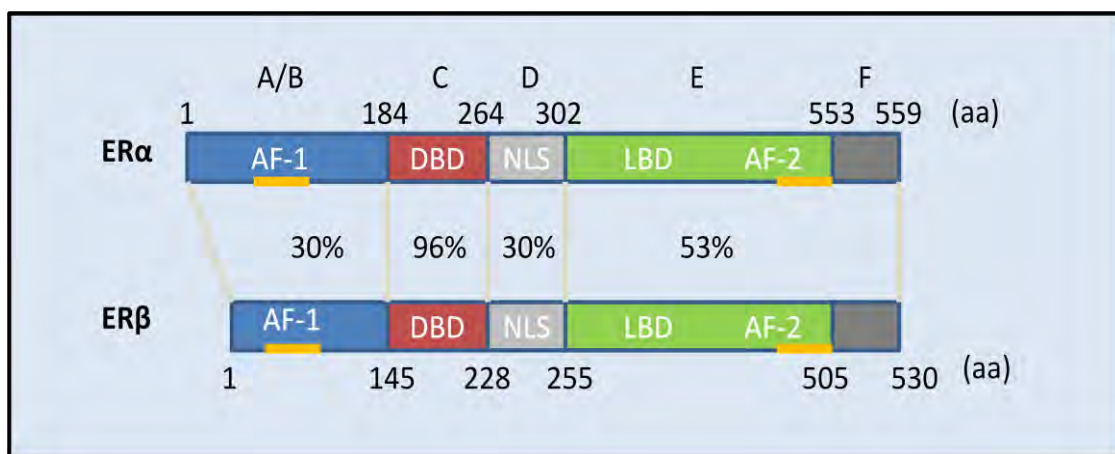


## 2.4 Structures et mécanismes d'action moléculaire des ERs

### 2.4.1 Structures des protéines ERs

#### Structure et homologie des ER $\alpha$ et ER $\beta$

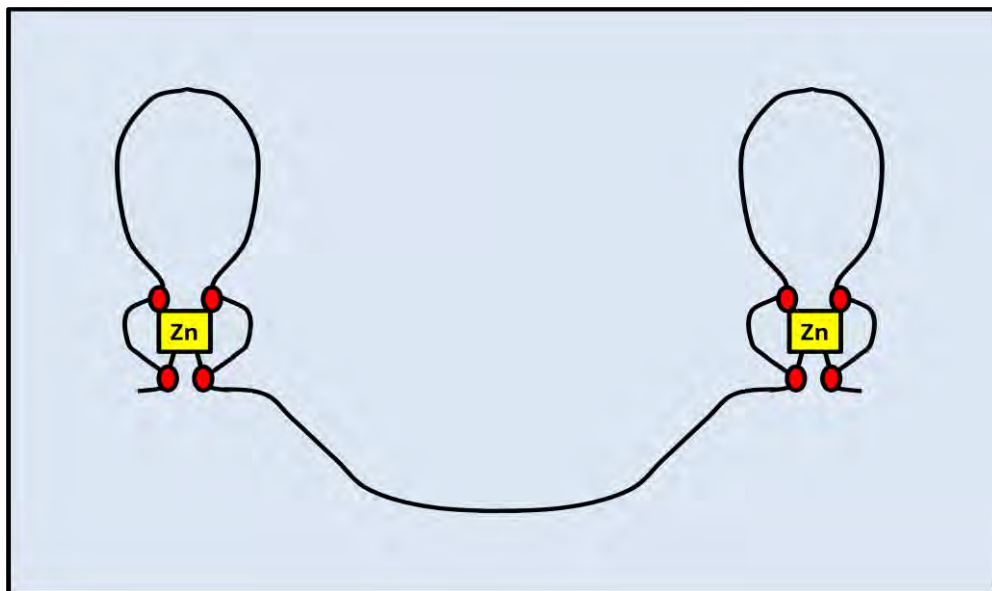
Ces récepteurs possèdent une structure modulaire comprenant 6 régions distinctes de A à F (Kumar et al, 1987). Les domaines de l'ER $\alpha$  et de l'ER $\beta$  présentent des séquences très proches (figure 12).



**Figure 12 : Structure et homologie des ER $\alpha$  et ER $\beta$  :** Les domaines de A à F sont représentés ainsi que le pourcentage d'identité en acides aminés pour chaque domaine individuellement. Les fonctions d'activation 1 (AF-1) et 2 (AF-2) sont également indiquées (*D'après Pearce et al, 2004*).

**Le domaine A/B** situé en N-terminal contient la fonction d'activation-1 de la transcription (AF-1) et des sites de phosphorylations (Gronemeyer et al, 1991). L'activation d'AF-1 peut être dépendante ou indépendante du ligand. Une fois activée elle pourra recruter des co-facteurs. La faible homologie de 30% entre ER $\alpha$  et ER $\beta$  qui atteint seulement 15% en N-terminal suggère un recrutement, au niveau de ce domaine, de co-facteurs différents pour les deux récepteurs. Par ailleurs il est à noter que l'activité du domaine AF-1 du RE $\beta$  est négligeable comparée à celle de ER $\alpha$  (Mac Gregor et al, 1998 ; Cowley et Kopal, 1999).

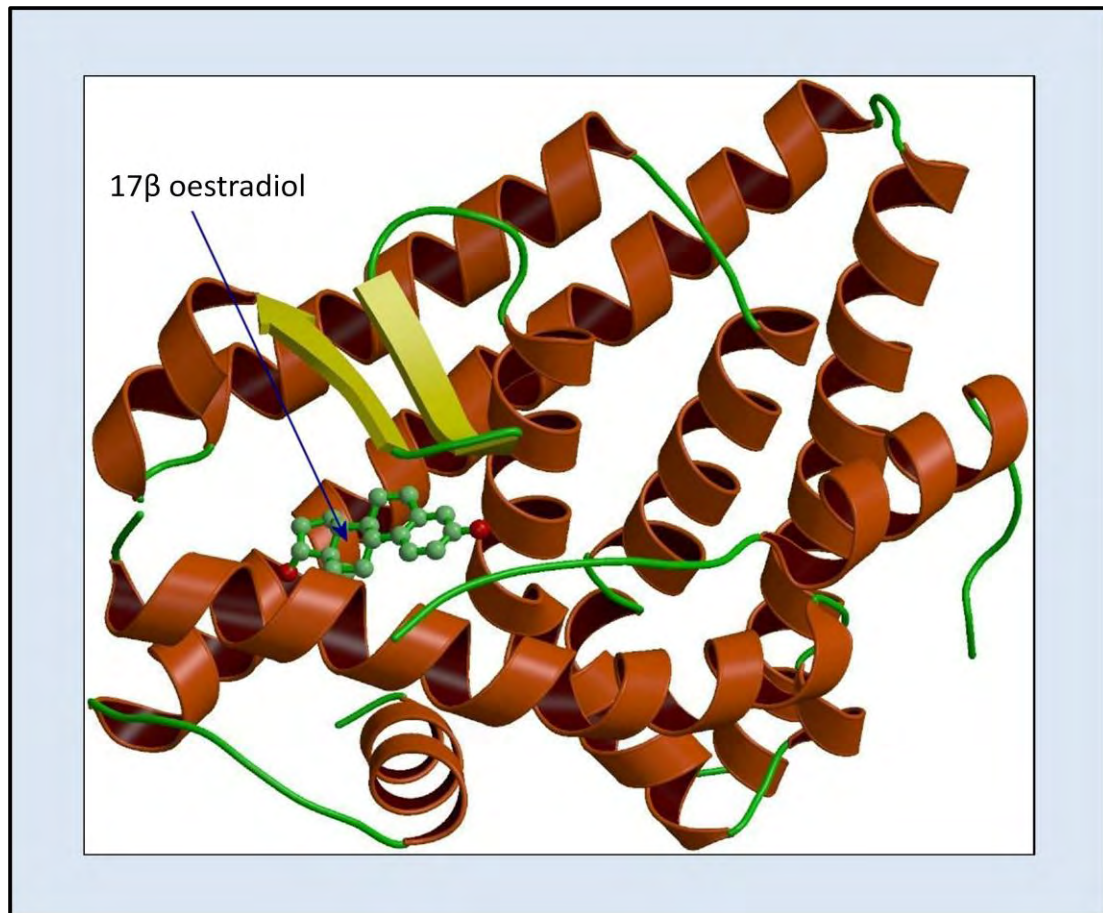
**Le domaine C** est le domaine de liaison d'ER à l'ADN (DNA Binding Domain : DBD). Il permet de lier ER à l'ADN sur des séquences régulatrices palindromiques spécifiques appelées "Elément de Réponse à l'Estradiol" (ERE) (Kumar et al, 1986). La région du DBD qui permet la liaison à l'ADN correspond à deux régions en doigts de zinc formées chacune par 4 cystéines liant un atome de zinc (figure 13). Il contient aussi des domaines de dimérisation et de liaison aux co-facteurs. Ce domaine est le plus conservé entre les espèces et entre les deux récepteurs avec une homologie de 96%. Cette grande similitude permet donc aux deux récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  de lier les mêmes séquences.



**Figure 13.** Représentation schématique des régions en doigt de zinc du DBD d'ER. Le trait noir représente la structure protéique secondaire au niveau de la région en doigt de zinc ; en rouge, les cystéines ; en jaune, l'atome de zinc noté Zn.

**Le domaine D** est une région charnière peu conservée (30%) qui contribue à la spécificité de la fixation du récepteur à l'ADN. C'est une région flexible qui change de conformation lorsque le ligand se lie et qui contient des signaux de localisation nucléaire permettant à ER de se localiser dans le noyau (Ylikomi et al, 1992). Certains co-facteurs peuvent lier ce domaine.

**Le domaine E/F** comprend le domaine de liaison au ligand (LBD). Le LBD est structuré en une succession de douze hélices alpha amphipatiques (notées H1 à H12) et de deux feuillets Bêta formant une cavité au niveau de laquelle va se loger l'E2 (figure 14) (Brzozowski et al, 1997). L'Hélice  $\alpha 12$  comprend la fonction d'activation-2 de la transcription (AF-2), elle nécessite la liaison préalable du ligand pour être activée et elle joue un rôle important dans l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire par sa capacité à interagir avec les co-facteurs (Tora et al, 1989). Le domaine E/F est, par ailleurs, impliqué comme le domaine C dans la dimérisation du récepteur (Kumar et al, 1988). L'homologie entre les deux récepteurs pour ce domaine n'est que de 53% ce qui explique les différences d'affinité pour certains ligands. En ce qui concerne l'E2, les deux récepteurs ont une affinité similaire, néanmoins, l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  est plus faible que celle d'ER $\alpha$ . Cette différence dans l'activité fonctionnelle peut s'expliquer en partie par le fait que les deux fonctions d'activations AF-1 et AF-2 se potentialisent pour une activité transcriptionnelle optimale or comme nous l'avons dit ER $\beta$  possède une activité AF-1 négligeable (Hall et al, 1999 ; Zwart et al, 2010). En ce qui concerne les autres ligands tels que les anti-estrogènes et les phytoestrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont des affinités différentes (Magee et al, 2004).



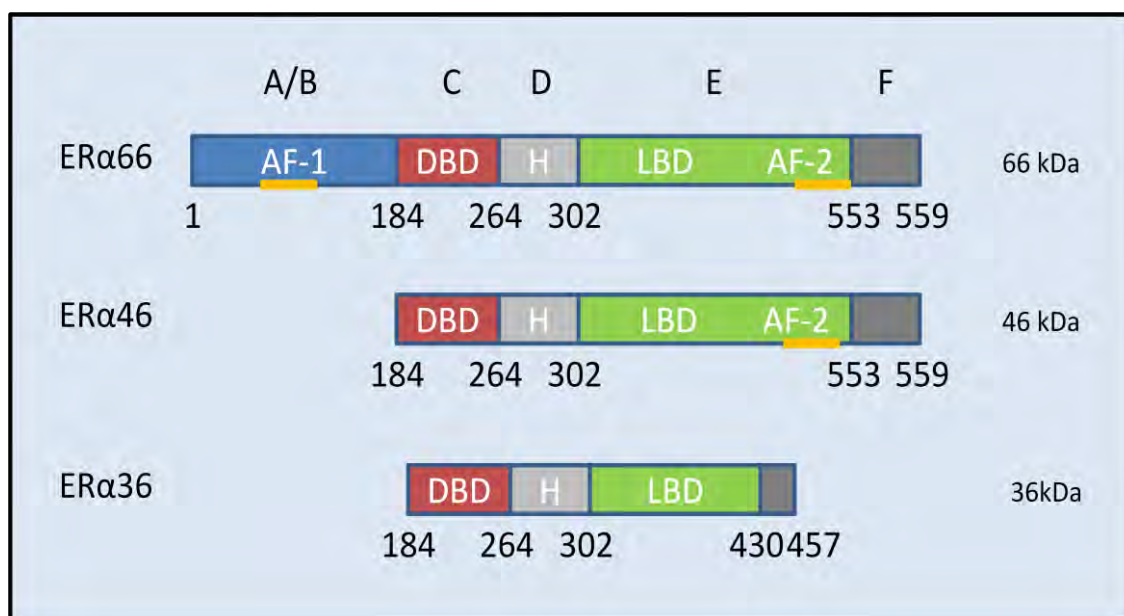
*d'après Roger Perkins virtual Fossil museum, [www.fossilmuseum.net](http://www.fossilmuseum.net)*

**Figure 14. Structure tridimensionnelle partielle du domaine de fixation du ligand (LBD) des ERs lié au 17β oestradiol (E2).** La représentation en ruban montre l'organisation du LBD en hélices α (rubans marrons) et feuillet β (rubans jaunes). L'E2 correspond à la structure cyclique verte indiquée par une flèche.

### **Isoformes**

Il existe plusieurs isoformes des ER. En accord avec son rôle de facteur de transcription, le ERα, 66 kDa (ERα66), se localise surtout dans le noyau et représente l'isoforme principale. Une isoforme de 46 kDa (ERα46) a également été mise en évidence. Elle est dépourvue des 173 premiers acides aminés et en conséquence ne possède pas de domaine AF-1 (voir chap 2.4 Structure et mécanisme d'action moléculaire des ERs) (Flouriot et al, 2000). Cette isoforme est décrite dans les cellules cancéreuses MCF-7, les ostéoblastes, les macrophages, et les cellules endothéliales, elle réprime l'activité AF-1 d'ERα66 et inhibe

la transcription du gène pS2 en recrutant des co-represseurs (Penot et al, 2005). Une autre isoforme a été trouvée dans les lignées de cancer du sein. Il s'agit d'une isoforme de 36-kDa (ER $\alpha$ 36) qui ne possède ni AF-1 ni AF-2. Cette isoforme participe à la signalisation non génomique d'E2 via les protéines kinases activées par des mitogènes (*Mitogen*-activated protein kinases, MAPK) (Zhang et al, 2011). Ces isoformes d'ER $\alpha$  pourraient participer à certaines résistances aux traitements endocrines (Le Romancer et al, 2011). D'autres variants d'épissages (Poola et al, 2000) existent pour lesquels il n'a pas encore été montré de rôle biologique (figure 15).



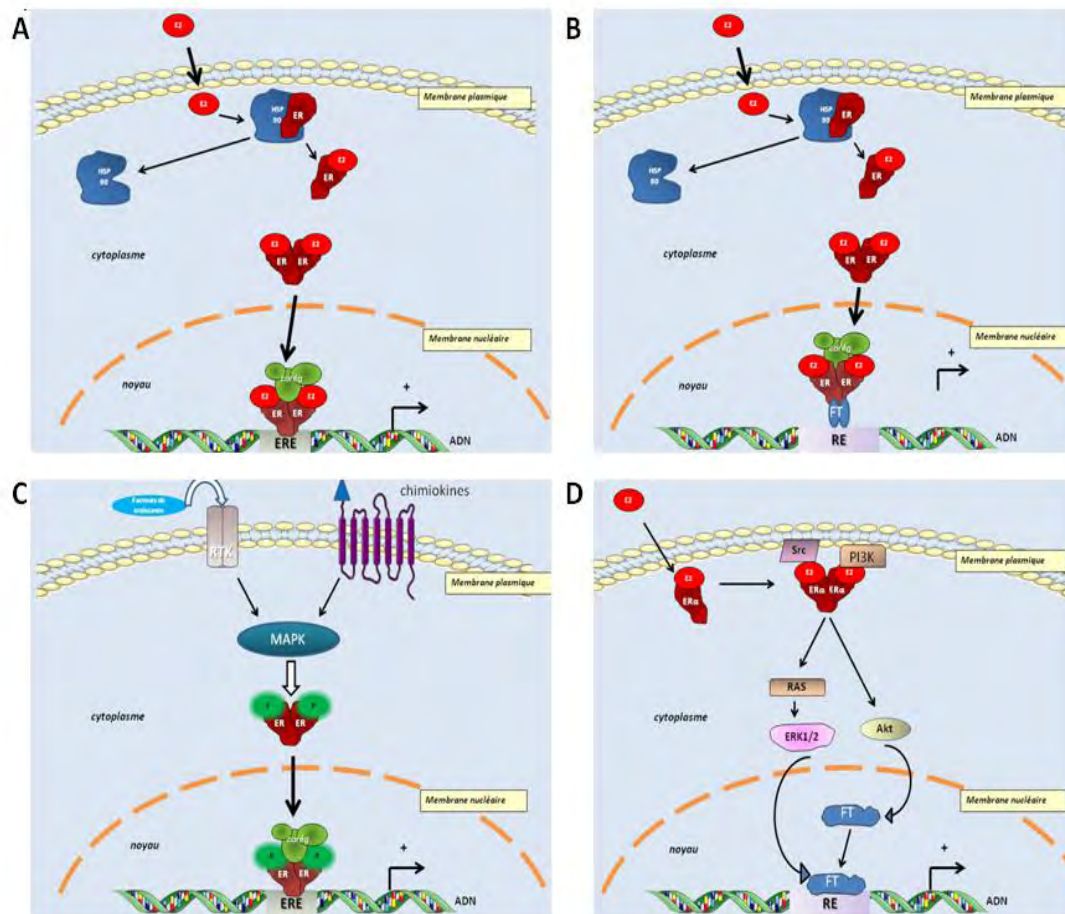
**Figure 15. Les isoformes d'ER $\alpha$**  : les différents domaines des trois isoformes possédant des fonctions connues sont représentés : ER $\alpha$ 66 kDa, l'isoforme principale et majoritaire, ER $\alpha$  46 kDa une forme tronquée de ER $\alpha$ 66 qui ne possède pas de domaine AF-1 et ER $\alpha$ 36 kDa qui ne possède ni AF-1 ni AF-2.

Pour ER $\beta$  il existe aussi plusieurs isoformes identifiées dans les tumeurs du sein parmi lesquelles la forme de 530 acides aminés (Ogawa et al, 1998) est considérée comme la forme sauvage et la signification fonctionnelle des autres formes reste peu clarifiée (Lewandowski et al, 2002). Comme pour ER $\alpha$  elles seraient susceptibles d'être impliquées dans la résistance aux traitements endocrines (Skloris et al, 2006).



## 2.4.2-Les différents mécanismes d'action des ERs

Les différentes voies de signalisation des ER sont présentées sur un même schéma (figure 16) pour permettre d'avoir une vue d'ensemble mais seront, pour des raisons didactique, traitées les unes après les autres.



*D'après Le Romancer M et al. Endocrine Reviews 2011;32:597-622*



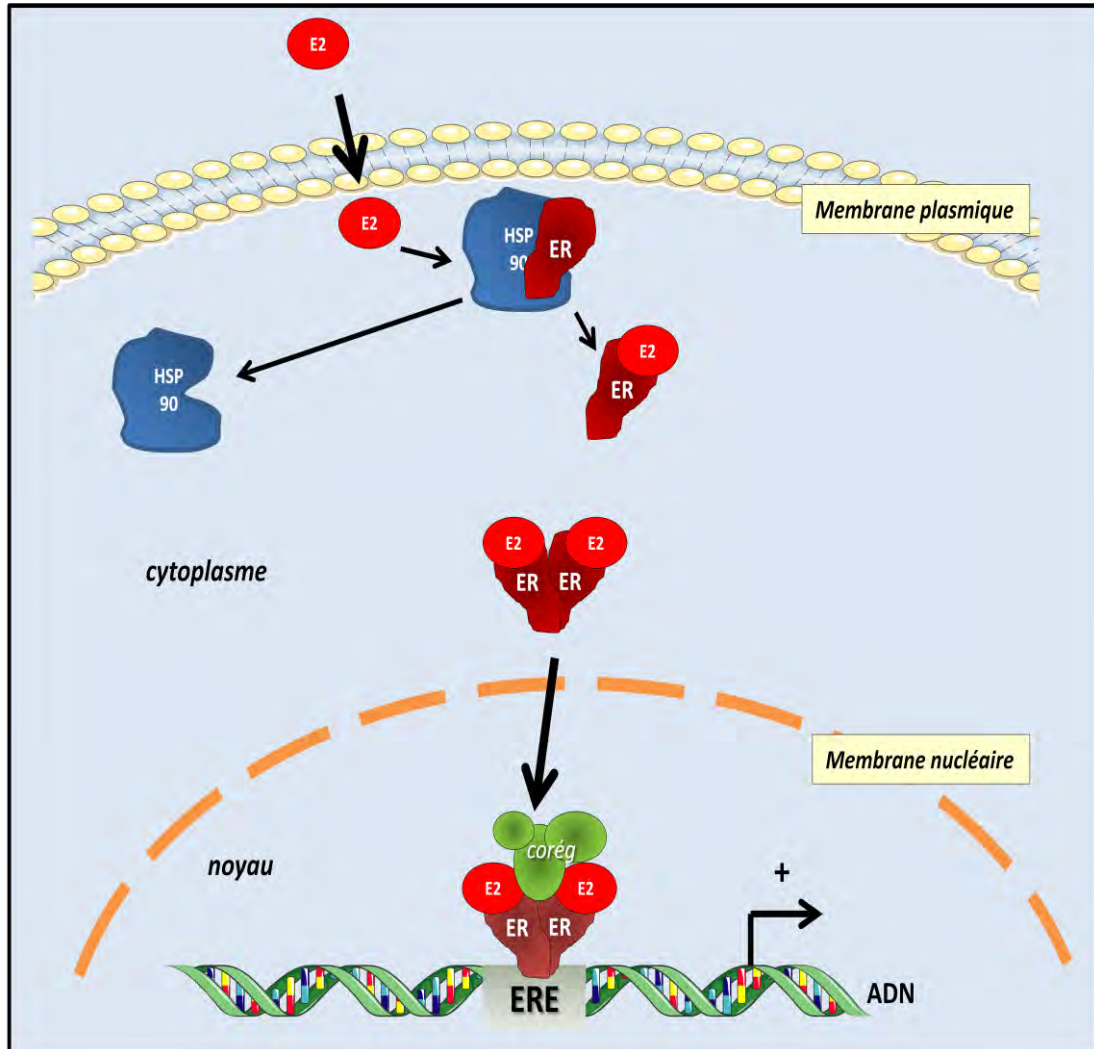
**Figure 16 : Les 4 différentes voies de signalisation des ER.** A : **voie génomique classique** ; les ER liés à l'E2 se dimérisent, pénètrent dans le noyau pour se lier à l'ADN, sur un **ERE** (estrogen response element), puis des co-régulateurs seront recrutés afin d'activer la transcription des gènes cibles. B : **voie génomique non classique** ; les ER vont se lier indirectement à l'ADN par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription tel que **AP-1** (Activator protéine 1). C : **voie indépendante d'E2** : les ER sont activés par des phosphorylations (P) induites par les facteurs de croissance ou les chimiokines. D : **voie non génomique** ; ER $\alpha$  est localisé à proximité de la membrane plasmique, il va lier l'E2 et recruter des protéines kinases (**SRC** : Steroid Receptor Co-activator et **PI3K** : Phosphatidylinositol 3 Kinase) et cette liaison va activer des cascades de signalisation (protéine kinase B (**Akt**), MAPK). Toutes ces voies convergent pour stimuler la prolifération et la survie cellulaire.

**RE** : élément de réponse aux autres facteurs de transcriptions ; **P** : phosphorylations ; **RTK** : récepteur à tyrosine kinase; **CoReg** : co-régulateurs; **FT** : facteur de transcription; **RAS** : famille de GTPase ; **ERK** : Extracellular signal-regulated kinases qui appartient à la famille des MAPK



## Voie génomique

### Voie classique ou voie dépendante du ligand



*D'après le Romancer et al, 2011*

**Figure 17. Voie génomique classique :** E2 : 17 $\beta$  oestradiol, HSP90 : heat shock protein 90; ER : récepteurs aux oestrogènes  $\alpha$  et  $\beta$ ; Corég : corégulateurs; ERE : élément de réponse aux oestrogènes; ADN : acide désoxyribonucléique

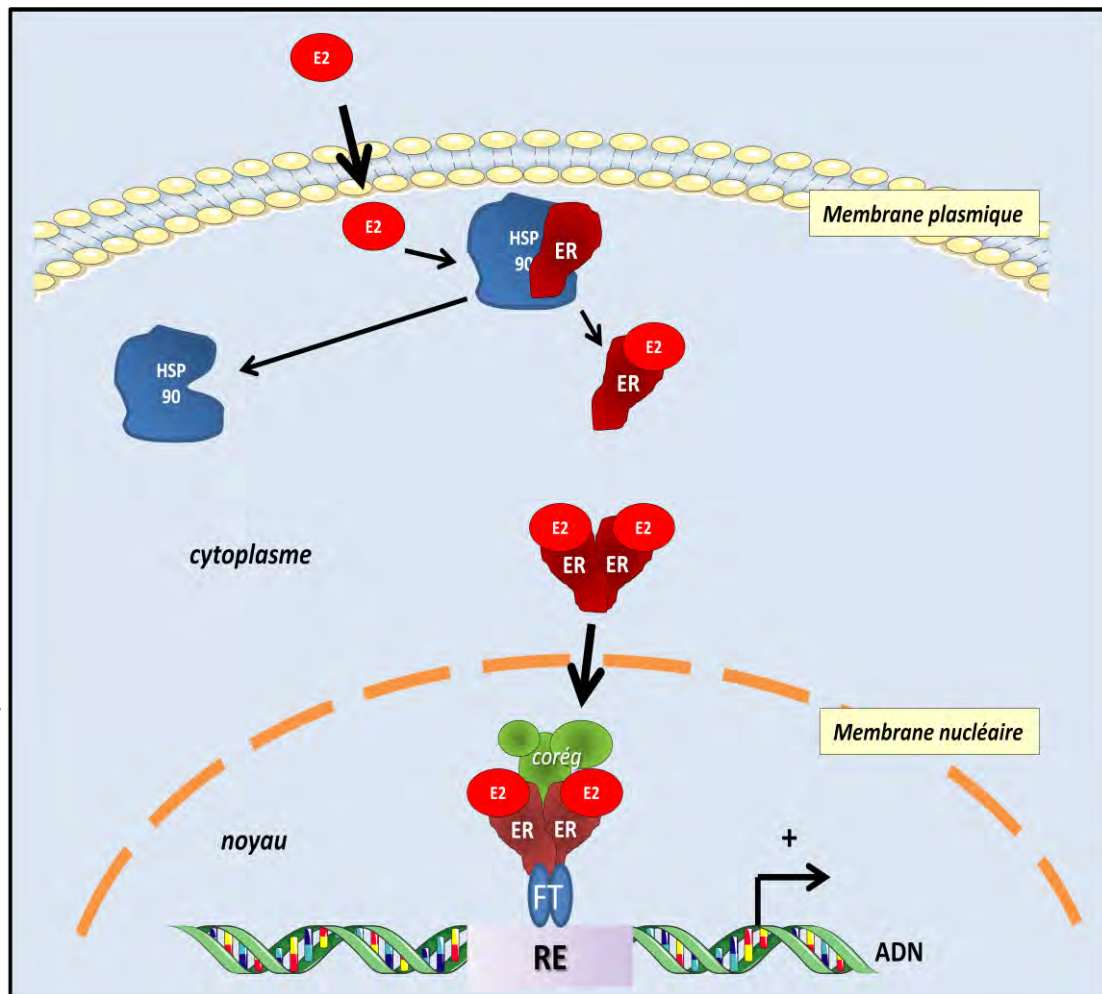
En l'absence de ligand, le récepteur est séquestré dans le cytoplasme de la cellule cible dans un complexe inhibiteur avec des heat shock proteins 90 (HSP90). La liaison du ligand induit un changement de conformation du ER qui induit sa séparation des HSP90 et son homo- ou hétéro-dimérisation ainsi que sa fixation sur des séquences d'ADN sur le gène

cible qui correspondent à des séquences régulatrices promotrices « enhancers » nommées ERE pour élément de réponse aux œstrogènes (Figure 17) (Gougelet et al, 2005). La séquence ERE de longueur minimale qui permet de lier l'ER et de répondre aux œstrogènes est une séquence palindromique de 13pb (5'-GGTCAnnnTGACC-3') (Klein-Hitpass et al, 1986). Cette séquence minimale est la séquence nucléotidique dite « ERE consensus » qui est considérée comme optimale pour la liaison à ER. Cependant la plupart des gènes contiennent des variations de certains nucléotides par rapport à cette séquence consensus. On parle de séquences dégénérées ou « ERE like » par rapport à la séquence référente. Les nucléotides présents de chaque côté de cette séquence ERE ou « ERE like » jouent aussi un rôle dans l'affinité de la liaison d'ER à l'ADN. Leur présence permet de conserver l'affinité ERE-RE malgré des variations de la séquence consensus minimale. Sans ces séquences latérales l'ERE dégénéré perdrait toute affinité pour l'ER. Ainsi, la dégénérescence de cette séquence ERE et les variations des nucléotides situés de part et d'autre vont être différents selon les gènes cibles et à l'origine des différences d'affinité d'ER pour ces gènes (Driscoll et al, 1998). Il existe également des éléments régulateurs consistant en des ½ ERE qui peuvent coopérer les uns avec les autres ou avec un site SP1 pour permettre la signalisation d'ER (voir chapitre suivant : La voie génomique non classique : ERE indépendante page 59) (O'loné et al, 2004). Une autre région de régulation directe de la liaison d'ER à l'ADN est la région de l'ADN liant le facteur stéroïde-1 du récepteur nucléaire hormonal orphelin. Seul ER $\alpha$  est capable de lier cette région (O'loné et al, 2004).

Les variations que nous venons de décrire qui caractérisent les ERE vont tout comme le ligand avoir un impact sur la conformation d'ER. Les variations de conformation résultant de ces deux paramètres, vont influencer l'association et la dissociation des complexes de co-régulateurs avec l'ER. Les co-régulateurs possèdent des activités enzymatiques qui vont réguler la fonction chromatinienne, c'est-à-dire, le remodelage des nucléosomes, l'acétylation,

ou la méthylation des histones et la liaison avec la machine transcriptionnelle de base (Le romancer et al, 2011). D'une façon générale et brièvement car cela sera expliqué plus en détail dans le chapitre sur les cofacteurs p64 : lorsque le ligand est E2, le changement conformationnel d'ER induit sa liaison avec des complexes co-activateurs. Ces co-activateurs stabilisent la formation d'un complexe pré-initiateur de la transcription et facilite la dissociation de la chromatine au niveau de l'ERE et ainsi active la transcription du gène cible. C'est le cas par exemple pour RP (Kraus et al, 1994) et pour le trefoil factor 1 (TFF1 ou PS2) (Ribieras et al, 1998) qui dépendent tous les deux, entre autres, de ce type de fonctionnement dit « classique » (E2-ER-ERE). Au contraire, lorsque ce sont des antagonistes de l'E2 comme dans certains cas les SERM (voir chapitre sur le traitement du cancer du sein), le changement conformationnel de ER induit son association non à des co-activateurs mais à des co-represseurs comme le silencing mediator of retinoïd and thyroïde receptors (SMRT) et nuclear receptors co-repressor (NCoR) qui au contraire vont inhiber la transcription (voir chapitre sur les co-régulateurs).

## La voie génomique non classique : ERE indépendante

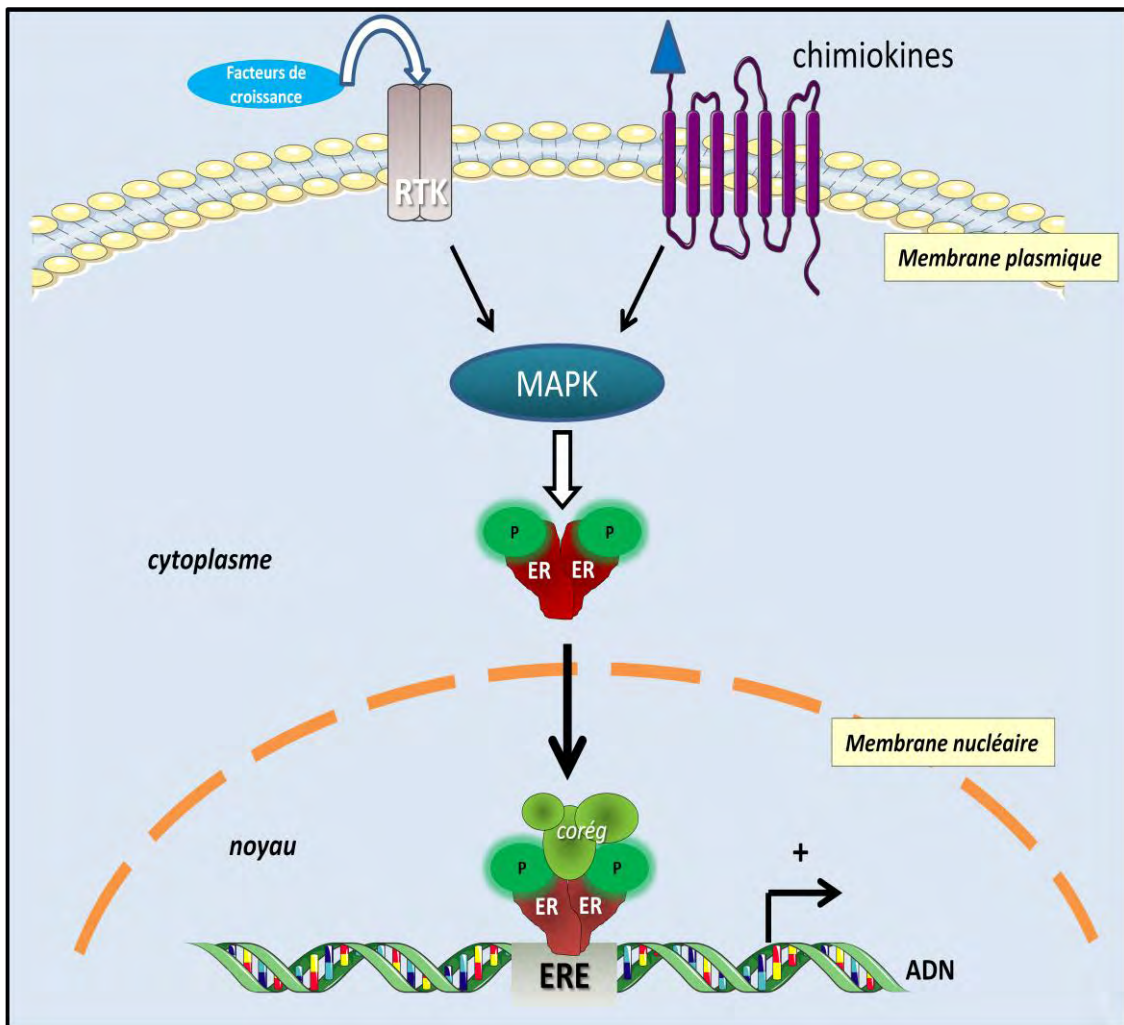


**Figure 18. Voie génomique non classique :** E2 :  $17\beta$  œstradiol, HSP90 : heat shock protein 90; ER récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  ; Corég : co-régulateurs ; FT : facteur de transcription RE : élément de réponse aux facteurs de transcription ; ADN : acide désoxyribonucléique

Dans cette voie de signalisation (figure18) l'élément de réponse n'est pas un ERE et l'ER module la transcription sans se lier directement avec l'ADN. Ainsi, l'ER régule la transcription des gènes en modifiant l'activité d'autres facteurs de transcription tels que la protéine-1 d'activation (Ap1 (Jun/fos)), la protéine-1 spécifique (SP1), le facteur nucléaire-kB (NF-kB) (Paech et al, 1997 ; Saville et al, 2000 ; Kalaitzidis et Gilmore, 2005), les facteurs

d'activation transcriptionnels (ATF)-2/c-jun, (ATF)-2/adénosine monophosphate cyclique (AMPC), la protéine de liaison à l'élément de réponse AMPC (CREB) et ATF-1/(CREB) et le facteur de transcription nucléaire- $\gamma$ . D'un point de vue fonctionnel en réponse à une stimulation oestrogénique, ER va promouvoir la liaison des autres facteurs de transcription sur la région d'ADN régulatrice qui leur correspond et participer au recrutement de co-facteurs et à la transcription du gène cible. Par exemple, en réponse aux œstrogènes, ER associé à SP1 va stimuler la transcription d'E2F1 (facteur 1 liant le promoteur E2) (Porter et al 1997 ; Safe, 2001). De la même manière, l'association d'ER avec Ap1 va activer la transcription du facteur de croissance-1 à l'insuline growth factor-1(IGF-1) (Gaub et al, 1990). Trente cinq pour cent des gènes humains répondent aux œstrogènes par ce système alternatif contrairement aux autres mammifères qui répondent majoritairement aux œstrogènes par la liaison directe d'ER à l'ADN. Cette voie permet donc une plus grande diversité de réponses aux œstrogènes chez l'homme par rapport aux autres mammifères puisque cela étend la transcription à une plus grande variété de promoteurs/enhancers et aussi à différents environnements cellulaires.

**Voie d'activation d'ER indépendante du ligand : Interaction avec les facteurs de croissances**



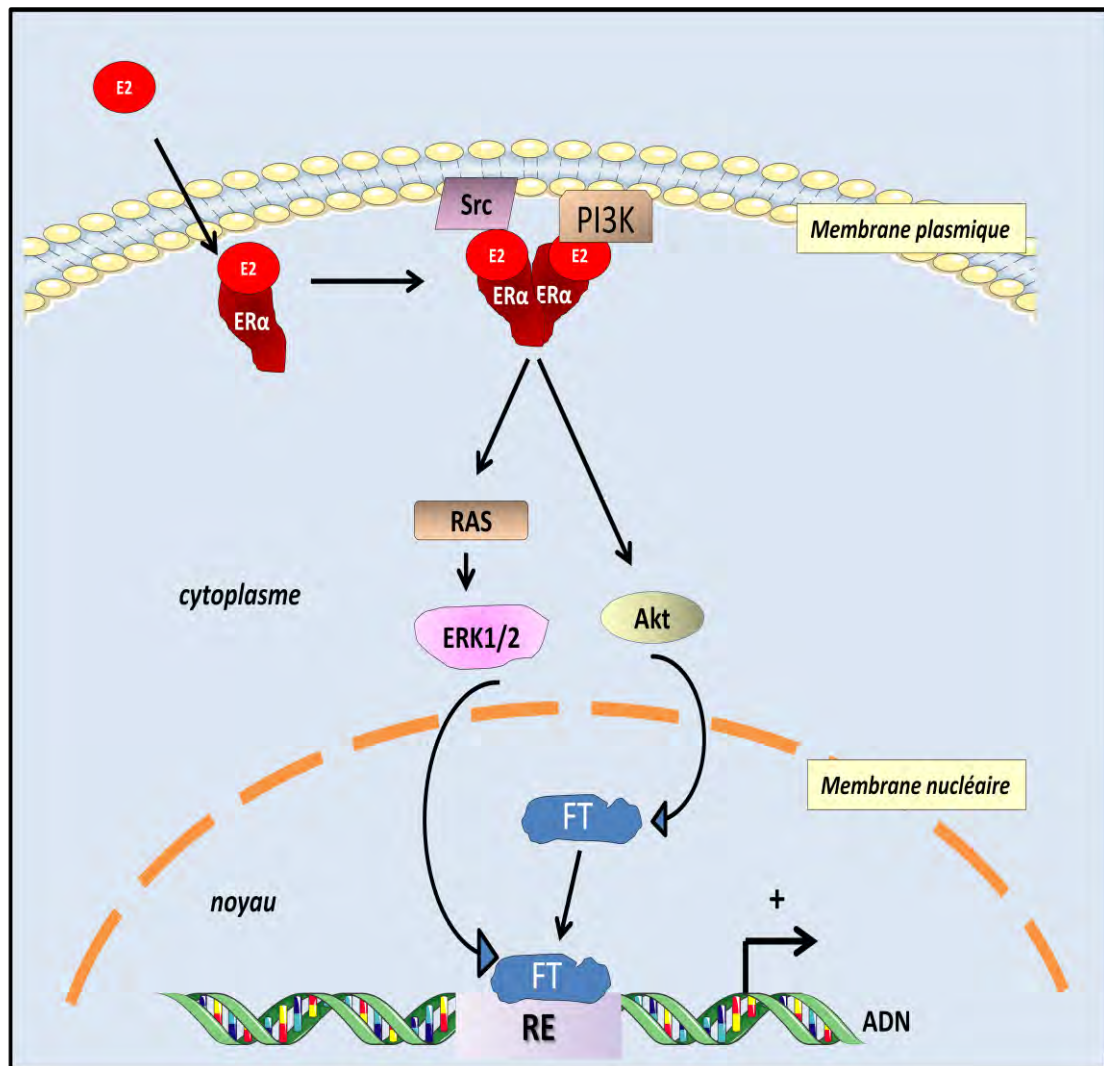
**Figure 19. Voie génomique non classique :** RTK : récepteur à tyrosine kinase; MAPK :Mitogen-activated protein kinases ; P : phosphorylations; ER récepteurs aux œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  ; Corég : co-régulateurs ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes; ADN : acide désoxyribonucléique

En l'absence de ligand, l'ER peut être activé par des signaux extra cellulaires (figure 19). Les facteurs de croissance tels que l'Epidermal Growth Factor (EGF), héréguiline et l'IGF-1 vont se lier à leurs récepteurs membranaires et vont déclencher une cascade de signalisation impliquant les « Mitogen-activated protein kinases » (MAPK) qui sont des protéines kinases phosphorylant spécifiquement les résidus serine et thréonine. C'est ainsi que l'ER sera phosphorylé sur son domaine AF-1 et activé (Kato et al, 1995 ; El-Tanani et al,

1997 ; Smith et al, 1998 ; Kato, 2001 ; Sauvé et al, 2009). En ce qui concerne ER $\beta$ , il peut en plus être phosphorylé par le signal de CXCL12/stromal cell-derived factor-1(SDF-1). Cette voie indépendante du ligand va donc permettre d'activer ER en absence de ligand, d'amplifier la signalisation des facteurs de croissance afin de stimuler la prolifération cellulaire dans les tissus ER positifs et aussi d'amplifier le signal donné par la voie ligand dépendante (Ignar-Trowbridge et al, 1992 ; Curtis et al, 1996 ; Ankrapp et al, 1998 ; Sauvé et al, 2009).



## Voies non génomique



**Figure 20. Voies non génomique.** E2 : 17β œstradiol, ERα : récepteur aux œstrogènes α; Src : tyrosine-specific protein kinase (pp60<sup>src</sup>); PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase; RAS : famille de GTPase; ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2; Akt : protéine kinase B; FT: facteurs de transcription; RE : élément de réponse aux autres facteurs de transcription; ADN : acide désoxyribonucléique

Certains effets biologiques rapides des œstrogènes dans les os, le sein, la vascularisation, et le système nerveux sont le reflet d'un effet non génomique des œstrogènes. Cet effet commence à l'extérieur de la cellule et est transmis par des protéines impliquées dans la signalisation sans qu'il y ait de transcription de gène. Il existe un ensemble de preuves qui montrent que cette signalisation rapide est liée au ERα dans sa localisation membranaire



ce qui représente environ 5- 10% du ER $\alpha$  total (Hammes et al, 2007 ; Levin, 2009 ; Le Romancer et al, 2011). L'E2-ER $\alpha$  forme près de la membrane plasmique un macrocomplexe notamment avec le Steroid Receptor Co-activator (SRC), la sous unité p85 de la PI3kinase et d'autres protéines accessoires. Ce macrocomplexe peut rapidement activer des protéines kinases à l'origine d'une cascade de signalisation impliquant les MAPK, la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la protéine kinase C, les phosphatases, les amines cycliques (AMPc et GMPc) et le calcium. Ces signaux, et particulièrement la phosphorylation, transmettent des modifications post translationnelles à de nombreuses protéines. C'est ainsi que les enzymes peuvent être rapidement activées et les fonctions cellulaires rapidement adaptées (figure 20). Il a été montré que cette voie de signalisation n'est pas nécessaire pour le développement des organes reproducteurs et de la glande mammaire mais est nécessaire et suffisante par exemple dans les cellules endothéliales pour produire rapidement du monoxyde d'azote (NO). En ce qui concerne le cancer du sein, elle pourrait être impliquée dans des défauts de réponses aux dommages à l'ADN. En effet, il a été montré que cette voie de signalisation bloque des voies transmises par des membres de la famille des PI3K (ataxia-telangiectasia mutated (ATM) et Rad 3-related kinases (ATR)) qui permettent au niveau des check point du cycle cellulaire de bloquer les cellules avant la phase de synthèse ou la phase de division afin de lui permettre de réparer son ADN. Une telle inhibition pourrait alors être à l'origine d'accumulation de mutations et contribuer au développement et à la progression du cancer (Romancer et al, 2011).

Les cofacteurs sont des protéines recrutées par ER qui vont moduler la transcription des gènes cibles d'ER et nous allons dans le chapitre suivant expliquer leur fonction et leur mode d'interaction avec ER.

## **2.5 Les co-facteurs**

### **2.5.1-Définition**

Les co-facteurs représentent un groupe de plus de 50 protéines (McKenna et al, 1999 ; Hermanson et al, 2002 ; Mckenna, O'malley, 2002) et au moins un ARN (McKenna et al, 1999) qui vont réguler la transcription dépendante d'ER lorsqu'il est lié à l'ADN. En général les co-facteurs ne sont pas liés directement à l'ADN mais interagissent avec lui de façon indirecte par l'intermédiaire d'autres protéines comme les récepteurs nucléaires. Ils font partie le plus souvent de larges complexes multi-protéiques. D'une façon générale, les cofacteurs co-activateurs potentialisent et les co-facteurs co-represseurs répriment l'activité des récepteurs nucléaires. Certains co-facteurs peuvent posséder les deux fonctions. Le choix et le recrutement des co-facteurs par l'ER vont dépendre de sa conformation et donc leur recrutement dépendra du site de liaison d'ER sur l'ADN et de la présence ou non d'un ligand. Par ailleurs, en raison de leur grand nombre, ils ne peuvent pas tous être recrutés en même temps sur l'ER et c'est pourquoi ils vont agir en association les uns avec les autres et de manière séquentielle.

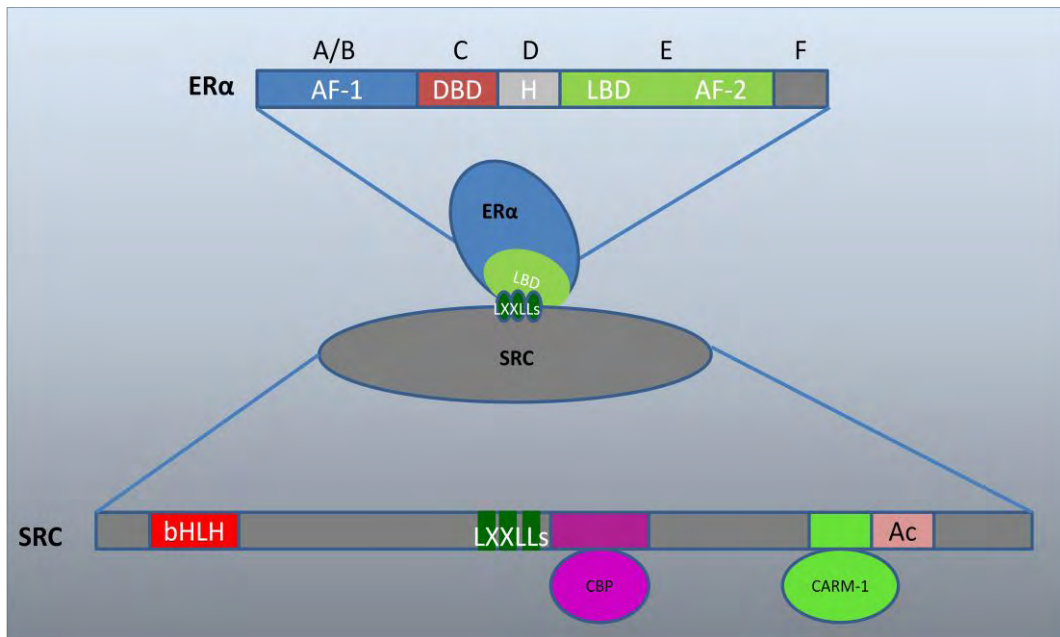
### **2.5.2-Interaction des co-facteurs avec ER**

#### **Le domaine de liaison LXXLL des co-activateurs interagit avec ER**

Les co-activateurs vont se lier à ER via son domaine AF-1, son domaine D, ou son domaine AF-2 ou encore de manière indirecte par l'intermédiaire d'autres co-facteurs (McKenna et al, 1999). Un même co-activateur peu lier les différents domaines d'ER ou être spécifique d'un des domaines. L'interaction entre les co-activateurs et AF-2 a été largement décrite dans la littérature ce qui n'est pas le cas pour les interactions avec les autres domaines. Ainsi la plupart des co-activateurs d'AF-2 possèdent une région LXXLL (L représente une

leucine et X n'importe quel acide aminé) (Le Douarin et al, 1996; Heery et al, 1997) déterminante pour leur liaison avec ER (Heery et al, 1997).

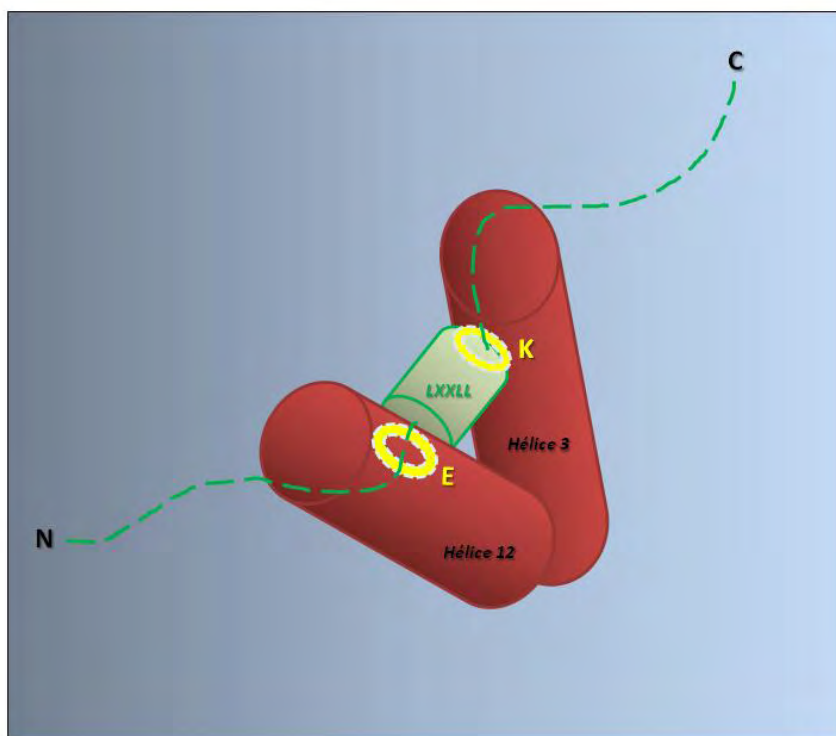
C'est grâce à l'étude de la famille SRC (Mc Kenna et al, 2002) (figure 21) qu'il a été montré que les co-activateurs pouvaient se lier au LBD des récepteurs nucléaires grâce à un motif LXXLL.



*D'après Mc Kenna et al 2002*

**Figure 21. Les domaines d'interaction entre ERα et SCR.** En haut sont représentés les domaines d'interaction fonctionnels de ERα : en bleu AF-1 (Activation function 1), en marron DBD (DNA binding domain), en gris H (domaine charnière), en vert LBD (ligand binding domain) et AF-2 (Activation function 2), en bas sont représentés les domaines d'interaction fonctionnels de SRC : en rouge bHLH (basic helix-loop-helix), en vert foncé LXXLLs (domaines où L représente une leucine et X n'importe quel acide aminé), en rose fuschia domaine d'interaction avec CBP (CREB (C-AMP Response Element-binding protein) -binding protein), en vert clair domaine d'interaction avec CARM-1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) et en saumon Ac (activité acetyl transférase). Au milieu, est schématisée l'interaction entre ERα (bleu) via son LBD (vert clair) et SRC (gris) via son domaine LXXLL (vert foncé).

Le motif LXXLL forme une hélice alpha courte et est nécessaire et suffisant pour assurer le lien entre les co-activateurs et l'ER $\alpha$  (Torchia et al, 1997). Il existe parfois plusieurs motifs LXXLL pour un seul co-activateur permettant une interaction coopérative avec le récepteur en dimère. Les hélices  $\alpha_{12}$  et  $\alpha_3$  du LBD forment une pince chargée qui agrippe le domaine LXXLL, du co-activateur et le place dans une poche hydrophobe du LBD (Skavur et al, 2004) (figure 22).

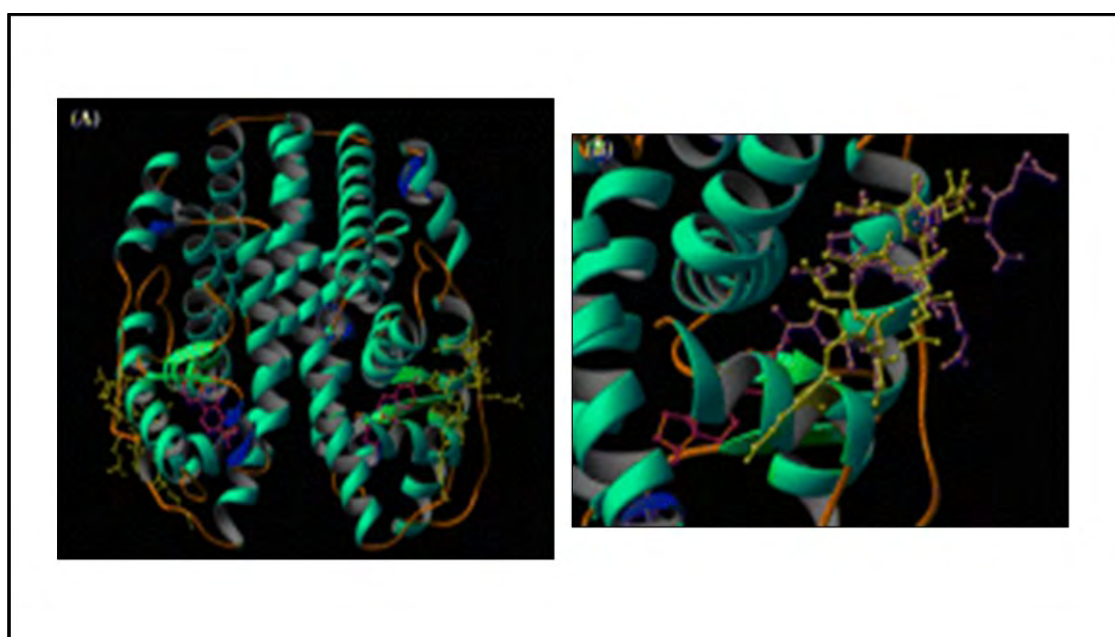


*D'après Savkur et al, 2004*

**Figure 22. Représentation schématique de la liaison du LXXLL des co-activateurs avec le LBD d'ER.** En marron, les Hélices  $\alpha_3$  et  $\alpha_{12}$  appartenant au LBD d'ER forment une pince chargée qui enserre le LXXLL (en vert clair) des co-activateurs. La charge négative du groupement carboxyl de l'acide glutamique (E) de l'hélice  $\alpha_{12}$  forme une liaison hydrogène avec la partie N-terminale du motif LXXLL et la charge positive du résidu lysine (K) de l'hélice  $\alpha_3$  se lie à l'extrémité carboxyl-terminale du LXXLL. Cela permet aux résidus leucines hydrophobes du domaine LXXLL de venir se mouler dans la cavité hydrophobe du LBD d'ER.

Ligne verte en pointillés : structure protéique simplifiée du co-activateur encadrant sa région LXXLL (d'après Skavur et al, 2004).

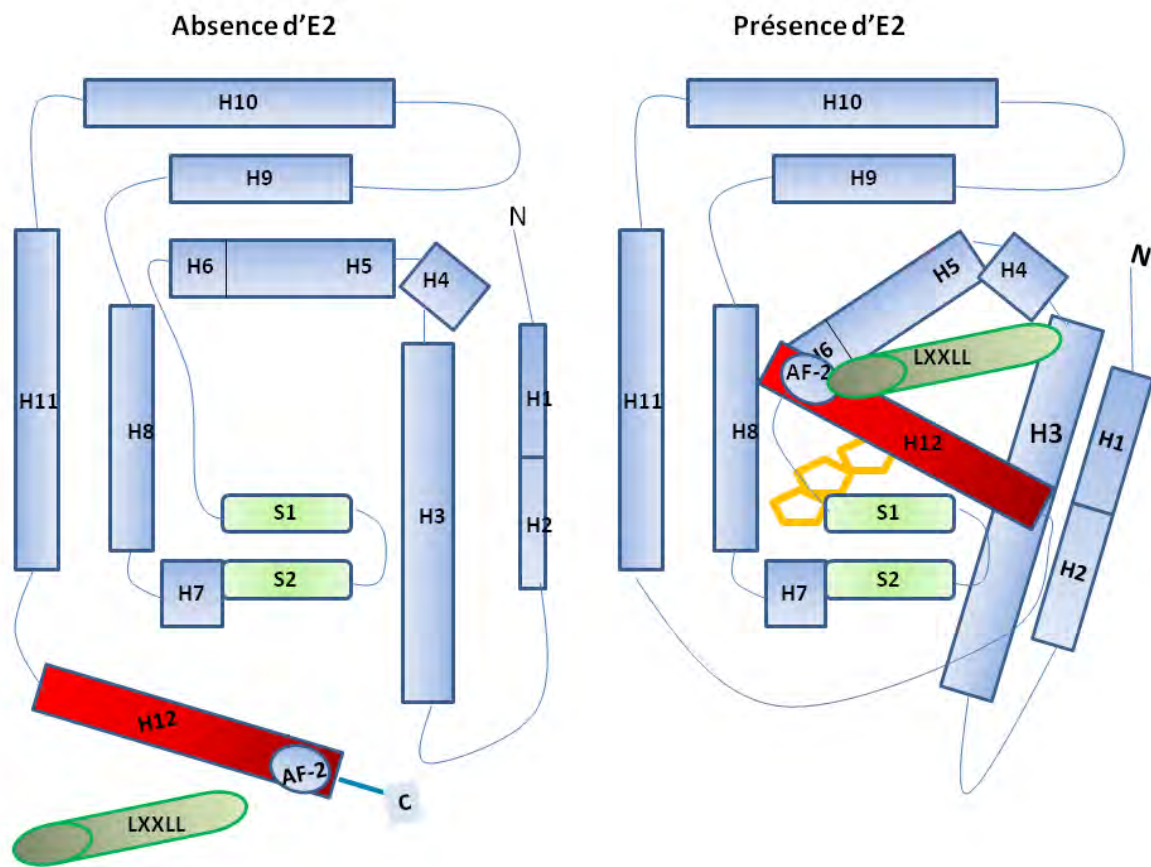
La spécificité et donc la force de la liaison de l'hélice LXXLL avec l'ER est déterminée par sa séquence et par les acides aminés qui l'encadrent (Heery et al, 2001). La qualité de cette liaison va aussi être modulée par les changements conformationnels d'ER induits par ses différents ligands. Ci-dessous une illustration (figure 23) permettant d'observer de manière tridimensionnelle une conformation favorable d'ER $\alpha$  induite par E2, lui permettant de lier le domaine LXXLL du modulateur peptidique-1 (PERM-1) (Savkur et al, 2004).



**Figure 23. Illustration tridimensionnelle du LBD d'ER.** Gauche : La structure au rayon X du LBD (ruban vert et bleu) du ER $\alpha$  (forme cyclique rouge) lié à l'E2 et au modulateur peptidique-1 du ER (PERM1 structure jaune) indique la structure tridimensionnelle globulaire composée de 3 couches d'hélices  $\alpha$  disposées en sandwich (ruban vert). Droite : Crystal illustrant l'interaction de PERM-1 avec le LBD d'ER $\alpha$  en présence du ligand. La boîte nuclear récepteur (NR) de SRC est en rose et est superposée sur PERM-1 en jaune (d'après Savkur et al, 2004)

La position relative de l'hélice  $\alpha_{12}$  dans le LBD va donc être modifiée par l'interaction du récepteur avec certains ligands. Lorsque ER lie un agoniste, l'hélice  $\alpha_{12}$  se replie de manière à former avec les hélices  $\alpha_3$  et  $\alpha_5$  une "pince" chargée et une poche hydrophobe dans


laquelle peut s'attacher et se placer le domaine LXXLL des co-activateurs (Shiau et al, 1998) (figure 24).



*D'après Brzozowski et al, 1997*

**Figure 24. E2 modifie la position relative de l'hélice  $\alpha 12$  au sein du LBD d'ER.** A gauche : schéma du LBD d'ER ne liant pas de ligand : La structure du LBD ne permet pas d'accrocher un domaine LXXLL. A droite : schéma du LBD d'ER liant un ligand l'E2, l'hélice  $\alpha 12$  forme avec les hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 5$  une poche hydrophobe pouvant accueillir le domaine LXXLL d'un co-activateur.

H1-H12 : hélice alpha du LBD du ER ; AF-2 : fonction d'activation-2 ; S1 et S2 : feuillets béta du

LBD du ER ;  : E2

En ce qui concerne les interactions des co-activateurs avec les autres domaines d'ER il est intéressant de noter que certains co-activateurs qui se lient au LBD grâce à leur domaine LXXLL en présence de ligand peuvent aussi lier le domaine A/B d'ER $\alpha$  de façon

indépendante du ligand. C'est le cas, par exemple, de SRC, CBP et p300 (Webb et al, 1998). D'autres vont se lier au domaine D comme les Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 $\alpha$ ) et 1 beta (PGC-1 $\beta$ ) (Tableau3)

### **Le domaine de liaison LXXI/HIXXXI/L des co-répresseurs interagit avec ER**

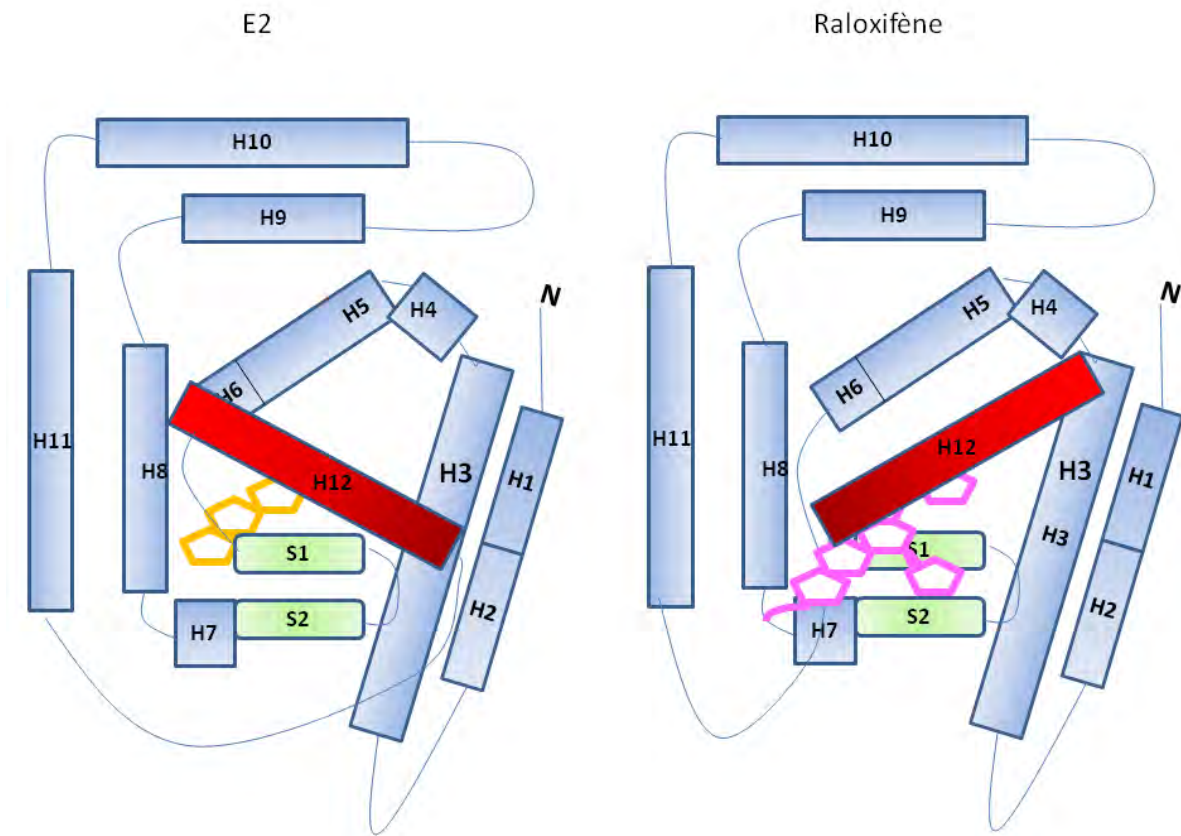
Comme pour les co-activateurs, les domaines AF-2 et AF-1 d'ER sont susceptibles de se lier aux co-répresseurs mais à l'inverse des co-activateurs, leur liaison à ER sera à l'origine d'une inhibition de la transcription. Cependant, comme nous allons le décrire, les liens entre les co-répresseurs et AF-2 ne sont pas si clairement établis et un certain nombre d'éléments suggèrent que les co-répresseurs ne se lient pas à AF-2 mais au DBD d'ER. De la même manière que pour les co-activateurs et à l'inverse de ce qui est connu pour les autres RN la liaison d'ER à un ligand est nécessaire pour que les co-répresseurs puissent lier ER. Enfin les co-répresseurs possèdent un domaine LXXI/HIXXXI/L les ('corner') box (CoRNR) analogue au LXXLL des co-activateurs qui est lui aussi déterminant pour leur liaison à ER.

Les premières études concernant les co-répresseurs ont été effectuées sur d'autres récepteurs nucléaires qu'ER $\alpha$  et elles ont mis en évidence deux co-répresseurs, le nuclear Co-repressor (NCoR) et le "silencing mediator for retinoïde and thyroïd hormone receptor" (SMRT). Ces études ont constaté que ces co-répresseurs se liaient fortement avec les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) et à l'acide rétinoïque (RAR) non liés au ligand. NCoR et SMRT se lient au LBD de TR et RAR par l'intermédiaire de domaines, positionnés en C-terminal, les ('corner') box (CoRNR) proches du LXXLL qui sont des domaines portant la séquence suivante LXXI/HIXXXI/L (L, leucine ; I, isoleucine ; X n'importe quel acide aminé; H, histidine) (Zhang et al, 1998 ; Perissi et al, 1999). Cette séquence est une hélice  $\alpha$  amphipatique plus étendue que celle déterminée par le LXXLL des co-activateurs. En absence

de ligand les co-répresseurs vont se loger via leurs CoRNR dans la poche hydrophobe du LBD de TR et RAR et bloquer le site AF2. Cependant le lien des co-répresseurs avec ER ne suit pas les mêmes règles. Premièrement, il s'agit d'un lien fragile qui ne se stabilise qu'en présence d'un ligand (Jackson et al, 1997). Différents ligands peuvent jouer un rôle antagoniste et recruter des co-répresseurs, ce sont par exemple les antagonistes partiels d'ER $\alpha$  tels que le Raloxifène et le Tamoxifène ou les antagonistes purs tel que l'ICI (Shang et al, 2000). Il a aussi été montré récemment que pour certains gènes, E2 pouvait aussi avoir un effet antagoniste et pouvait être à l'origine du recrutement de co-répresseurs par l'ER (Merrell et al, 2011). Deuxièmement, les études biochimiques et structurales ont montré que les co-répresseurs se lient difficilement au site AF-2 car ils sont en compétition pour ce site avec l'hélice  $\alpha$ 12 qui possède comme eux un motif CoRNR (Heldring et al, 2007 a) qui ferme le site AF-2 empêchant ainsi la liaison des co-répresseurs au niveau de ce domaine (figure 25). L'étude de Varlakhanova et al, 2010 est venue conforter le fait que les co-répresseurs ne lieraient pas le domaine AF-2 d'ER. Dans son étude elle montre que les domaines CoRNR de SMRT interagissent directement et fortement non pas avec le domaine AF-2 mais avec le domaine C d'ER. Dans cette étude il est également montré que l'interaction entre SMRT et le domaine C d'ER est modulée par la reconnaissance des sites de liaison d'ER $\alpha$  sur l'ADN. Enfin elle montre que la liaison de SMRT avec le domaine C, autrement dit DBD, n'empêche pas, du moins dans certains contextes, la liaison d'ER $\alpha$  à l'ADN. Récemment un nouveau co-répresseur CDK2-associated cullin (CAC1), a été décrit, qui lui aussi lie le DBD d'ER $\alpha$ . Ce nouveau co-répresseur réprime le récepteur en absence ou en présence d'E2 et son domaine CoRNR est déterminant pour sa liaison avec ER $\alpha$  (Kim et al, 2013). Hakai est encore un autre co-répresseur qui se lie au DBD d'ER $\alpha$  (Gong et al, 2010). Par contre, il a été montré que le receptor interacting protein of 140 kDa (RIP140) qui selon le contexte cellulaire peut avoir une fonction de co-répresseurs se lie au domaine AF-2 d'ER (Windahl et al, 1999 ; Hall et al,



2005). RIP140 ne possédant pas de domaine LXXI/HIXXXI/L mais un domaine LXXLL cela explique très bien pourquoi il peut, au contraire des autres co-répresseurs, lier AF-2.



*D'après Brzozowski et al, 1997*

**Figure 25. Le motif CoRNR de L'hélice  $\alpha$ 12 ferme le site AF-2 en présence d'antagonistes.** A gauche : schéma du LBD d'ER liant un ligand agoniste : l'E2, l'hélice  $\alpha$ 12 forme avec les hélices  $\alpha$ 3 et  $\alpha$ 5 une poche hydrophobe pouvant accueillir le domaine LXXLL d'un co-activateur. A droite : schéma du LBD d'ER liant un ligand antagoniste : le Raloxifène, l'hélice  $\alpha$  12 ferme la poche hydrophobe ne permettant pas aux co-répresseurs de venir se lier.

H1-H12 : hélice alpha du LBD du ER ; AF-2 : fonction d'activation-2 ; S1 et S2 : feuilletts béta du



### **2.5.3-Fonction des co-facteurs**

Afin de réguler l'activité d'ER, les cofacteurs possèdent différentes fonctions. Certaines sont directement liées à la transcription, telles que, la réorganisation de la chromatine, le recrutement des facteurs de base de la transcription et de la polymérase II. D'autres, lui sont rattachées plus indirectement, telles que les fonctions d'épissage et d'ubiquitination. Nous présentons dans ce chapitre les principaux co-régulateurs et leurs rôles.

#### **Fonction des co-activateurs**

##### **Les complexes de remodelage du nucléosome**

Des niveaux importants de compaction de la chromatine bloquent l'accès à l'ADN et donc à la transcription. Le passage d'une chromatine ouverte, transcriptionnellement active, à une chromatine fermée, transcriptionnellement inactive, va être régulée par des modifications du nucléosome et de la chromatine. Les facteurs connus pour être impliqués dans ce processus avec les récepteurs nucléaires sont des complexes de remodelage du nucléosome dépendant de l'ATP et des facteurs ayant une activité acétyltransférase ou méthyltransférase sur les histones.

##### **Les complexes de remodelage dépendants de l'ATP**

Ces complexes vont modifier la chromatine en changeant la position du nucléosome sur l'ADN. Ils vont pour cela déstabiliser les liens entre l'ADN et les histones en utilisant l'énergie de l'ATP (Peterson et al, 2002a, 2002b). Il existe trois familles de complexe de remodelage de la chromatine caractérisées chez la levure : les SWItch/Sucrose Non Fermentable (SWI/SNF) (Fryer et Archer, 1998 ; Kamei et al, 1996), les imitations SWI (ISWI), et les Chromodomain/helicase/DNA-binding domain (CHD). Ils comportent tous une sous-unité munie d'un domaine ATPasique et des domaines d'interaction à l'ADN (Wu C et al,

1997 ; Pazin et al, 1997a). En ce qui concerne le complexe homologue de SWI/SNF chez les mammifères hSWI/SNF (Kwon et al, 1994), il possède une protéine brahma-related gene 1 ( BRG1) (Neil J et al, 2010) avec une activité hélicase et ATPasique propre. BRG1 est un co-régulateur d'ER auquel il se lie indirectement via la famille SRC.

### **Les facteurs ayant une activité acétyltransférase et méthyltransférase sur les histones**

L'activité de transcription est directement corrélée au degré d'acétylation des histones. L'acétylation permet de réduire les charges positives des histones affaiblissant ainsi les forces d'attraction avec la charge négative de l'ADN conduisant à une décondensation de la chromatine la rendant plus accessible à la machinerie transcriptionnelle. C'est pourquoi les régions hyper-acétylées sont beaucoup plus transcrites que les régions hypo-acétylés. Le recrutement de complexes multiprotéiques contenant des facteurs avec une activité histone acétyltransférase (HAT) permet de lever cette inhibition due à la compaction de la chromatine (Pazin et al, 1997b). Ces facteurs peuvent se lier à ER directement ou indirectement en s'associant les uns avec les autres. Parmi ces facteurs, on trouve la famille SRC (SRC1, SCR2 et SCR3) (tableau 3) qui se lie directement au ER et qui, en plus de son activité HAT, peut recruter d'autres facteurs apportant leur activité propre. Elle va recruter, les facteurs CBP, et p300 qui eux aussi ont une activité HAT ou des facteurs avec d'autres activités comme par exemple le coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM-1) (tableau 3) et la protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) (tableau 3) qui apportent leur activité arginine -methyltransférase (Koh et al, 2001). L'activité méthyltransférase n'est pas être directement corrélée à un type fonctionnel de chromatine et son action sur l'activité transcriptionnelle peut être neutre, (Fischle et al, 2003) positive (Santos-Rosa et al, 2002) ou répressive (Wysocka at al, 2006).

Ces co-régulateurs qui possèdent des fonctions d'acétylation et de méthylation vont également participer à la transcription, plus indirectement, en agissant sur d'autres protéines que les histones. Ils vont notamment modifier d'autres co-régulateurs et l'ER lui-même afin de moduler leurs actions (Renoir, 2012).

### **Le complexe médiateur : mediator/TRAP**

Dans la littérature le mediator (tableau 3) est aussi nommé le "vitamin D receptor interacting proteins" (DRIP) coactivator complex ou "Thyroid Hormone Receptor-associated Proteins" (TRAP). Ce complexe décrit par (Kim et al, 1994) contient plus de 26 sous-unités, dans l'ensemble, peu conservées entre les espèces (Taatjes et al, 2010). Ces protéines vont agir en agonistes ou en antagonistes avec les autres complexes (Lee et al, 1995). Certaines de ces sous-unités sont des protéines modulaires qui appartiennent conjointement à d'autres complexes et qui n'ont pas d'activité enzymatique propre connue (Rachez et al, 1999). Le mediator possède une grande plasticité et va permettre d'associer entre elles différentes protéines avec différentes fonctions sur différents promoteurs. Le fonctionnement de ce complexe est encore mal connu, néanmoins il a été montré qu'il jouait un rôle crucial dans la régulation de la transcription générale et spécifique dépendante d'activateurs. Il joue aussi un rôle dans la transcription basale indépendante d'activateurs suggérant qu'il contrôle des événements fondamentaux dans l'initiation de la transcription. De plus il est évident qu'il promeut le recrutement de la RNAPolIII et stabilise son complexe sur les promoteurs et qu'il est donc important pour la RNAPolIII, elle-même, mais aussi pour l'expression des gènes. Par ailleurs il n'est pas qu'activateur de la transcription car il possède un sous-module : le CDK8 (CDK8 (cyclin-dependent protein serine/threonine kinase 8), cycline C, Med12, and Med13) qui a un rôle activateur ou inhibiteur de la transcription (Taatjes, 2010). Le mediator est recruté par ER via les deux domaines LXXLL de sa sous-unité 1 (Thyroid Hormone Receptor-associated Protein 220 kDa (TRAP220)) (Kang et al, 2002). De plus, il est

intéressant de noter que l'absence du gène *TRAP220* de cette sous unité du mediator est à l'origine d'une mortalité embryonnaire chez la souris (Näär et al, 1999 ; Malik et al, 2004).

### **Les complexes de la répression et du renouvellement de la transcription**

Ce sont des complexes qui contiennent les ubiquitines ligases comme l'ubiquitin ligase E6 associated (ou protein ubiquitin-protein ligase E3A) (E6-AP) (tableau 3) et la Mouse double minute 2 homolog (ou E3 ubiquitin-protein ligase) (MDM2) qui poly-ubiquitinent les protéines et déterminent leur dégradation par le protéasome. La dégradation et donc l'élimination des co-activateurs vont permettre la répression du récepteur mais elle est également requise pour que la transcription puisse se poursuivre.

### **Les complexes du traitement des ARN**

Des co-activateurs vont participer aux réactions en aval du processus de transcription tel que le traitement des ARN. Il s'agit par exemple de la protéine peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator (PPAR $\delta$ ) qui va participer à l'épissage des ARN transcrits (Auboeuf et al, 2002 ; Monsalve et al, 2000) (tableau 3).

**Tableau 3- Les co-activateurs d'après Hall et McDonnell 2005**

	Co-facteur	Nom complet	Autres noms	fonction	Interaction avec RE
<b>Co-activateurs du domaine AF-2</b>	<b>SRC-1(p160)</b>	Steroid receptor coactivator-1	NCoA-1	HAT (Histone acetyltranserase)	<b>Lient le domaine AF2 du ER via des motifs LXXLL</b>
	<b>SRC-2( p160)</b>	Steroid receptor coactivator-2	GRIP1, TIF-2, NCoA-2	HAT	
	<b>SRC-3 (p160)</b>	Steroid receptor coactivator-3	AIB1, ACTR, p/CIP, RAC3, TRAM-1, NCoA-3	HAT	
	<b>CBP/ p300</b>	CREB-binding protein/ Histone acetyltranserase p300		HAT	
	<b>TRAP/DRIP</b>	Thyroid hormone receptor activating protein/ vitamin D receptor interacting protein	<b>mediator</b>		
	<b>ASC-1</b>	Activating signal cointegrator-1		Lient les HATs et les NRs	
	<b>ASC-2</b>	Activating signal cointegrator-2	RAP250, TRBP, AIB3		
<b>Co-activateurs du domaine AF-1</b>	<b>SRA</b>	Steroid receptor activator		épissage	<b>Lient le domaine AF1 du ER</b>
	<b>p68</b>	p68 RNA helicase		RNA hélicase	
<b>Co-activateurs secondaires</b>	<b>CARM1</b>	coactivator-associated arginine methyltransferase 1		Arginine histone methyltransferase	<b>Lient indirectement le domaine AF2 du ER via leur association avec SRC</b>
	<b>PRMT1</b>	protein arginine N-methyltransferase 1		Arginine histone methyltransferase	
	<b>CoCoA</b>	Coiled-coil coactivator			
	<b>BRG1</b>	Brhama related gene-1		Helicase Activité ATPase	
<b>Co-activateurs à multiples fonctions</b>	<b>E6-AP</b>	E6-associated protein	Protein ubiquitin-protein ligase E3A	Ubiquitine ligase	<b>Lient le domaine AF2 du ER</b>
	<b>RPF-1</b>	Receptor potentiating factor-1		Ubiquitine ligase	
	<b>PGC-1<math>\alpha</math>, PGC-1<math>\beta</math></b>	PPAR $\gamma$ coactivator-1		Surface de recrutement pour d'autres co-facteurs; épissage	<b>Lient la région H du ER</b>
	<b>CAPER-alpha CAPER-beta CoAA</b>	Coactivator of (AP-1) and estrogen receptors Coactivator activator		Potentiale l'activité du ER; épissage	<b>Lient indirectement ER</b>
	<b>MDM2</b>	Mouse double minute 2 homolog	E3 ubiquitin-protein ligase	Ubiquitine ligase	

## **Fonction des co-répresseurs (Tableau 4)**

### **Les facteurs ayant une activité histone déacetylase directe ou indirecte**

A l'inverse des HAT les histones déacetylases HDAC sont une super famille d'enzymes qui vont resserrer les liens entre l'ADN et les histones, inhiber le recrutement des co-activateurs et l'expression génique (Taunton et al, 1996). NCoR (Jackson et al, 1997), SMRT (Horlein et al, 1995) et RIP140 (Treuter et al, 1998) sont des co-répresseurs qui n'ont pas d'activité HDAC propre mais qui l'acquièrent en se liant à des protéines qui en possèdent une, telles que les HDAC (Hörlein et al, 1995; Nagy et al, 1997).

### **Facteurs compétiteurs**

Certains facteurs vont entraver l'accès au récepteur : par exemple, le "repressor of estrogen receptor activity" (REA) (Delage-Mourroux et al, 2000) et le "repressor of tamoxifen transcriptional activity" (RTA) (Norris et al, 2002), interfèrent avec SRC-1 ; Sharp réprime indirectement l'activité d' ER $\alpha$  induit par les œstrogènes via son effet sur le co-activateur SRA (Laherty et al, 1998) ; le "receptor interacting protein of 140 kDa" (RIP140) (Windahl et al, 1999) se lie fortement aux récepteurs nucléaires et joue un rôle à la fois de co-répresseur ou de co-activateur, il entre en compétition avec les facteurs liant AF-2 et son absence est à l'origine d'une stérilité chez les souris femelles (White et al, 2000) ; CDK2-associated cullin (CAC1) se lie à l'histone demethylase LSD1, un co-activateur reconnu d'ER $\alpha$  et réprime ainsi l'activité d'ER dépendante de ce facteur (Kim et al, 2013).

### **Facteurs du renouvellement**

C'est le cas du mammalian homolog of *Drosophila* Seven in absentia (mSiah2) qui régule la répression d'ER en ciblant NCoR vers le protéasome (Hall 2005).

**Tableau 4-Les co-répresseurs d'après Hall et McDonnell 2005**

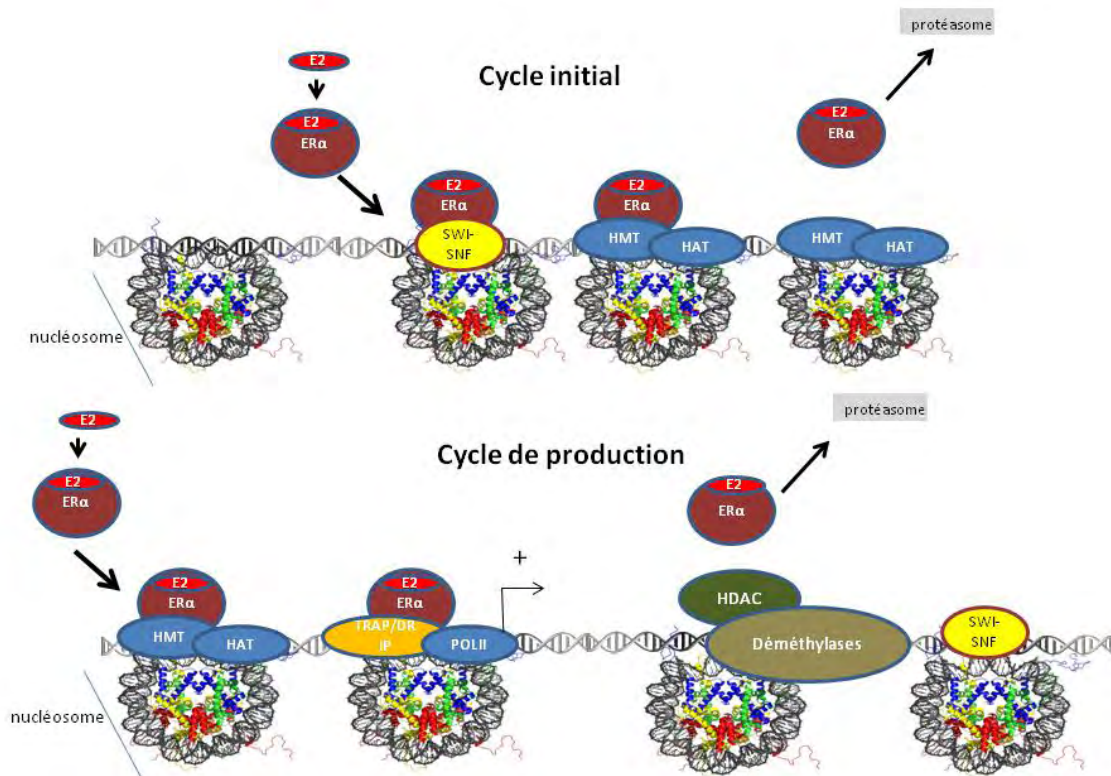
<b>Co-represseur</b>	<b>Nom complet</b>	<b>Function/Activité</b>	<b>Répression de RE</b>	<b>Interaction avec RE</b>
NCoR	Nuclear receptor corepressor	HDAC (Histone deacetylase)	Pharmacologique	Lie le DBD via le motif CoRNR
SMRT	Silencing mediator for retinoid and thyroid receptors	HDAC	Pharmacologique	Lie le DBD via le motif CoRNR
RIP140 (NRIP)	Receptor interacting protein of 140 kDa	Entre en compétition avec les co-activateurs du domaine AF-2 et s'associe avec les HDACs	Physiologique and Pharmacologique	Lie le domaine AF-2 du RE via Le motif LXXLL
REA	Repressor of estrogen receptor activity	Entre en compétition SRC-1	Physiologique	Indirecte
RTA	Repressor of tamoxifen transcriptional activity	Entre en compétition SRC-1 et réprime l'activité agoniste du tamoxifène	Pharmacologique	Lie le domaine AF-1 d'ER
mSiah2	Mammalian homolog of <i>Drosophila</i> Seven in absentia (sina)	Régule la repression en ciblant NCoR vers le proteasome	Pharmacologique	Lie l'ER directement via NCoR

#### 2.5.4 Modélisation du mode d'action des co-facteurs

Le déroulement et la régulation de la transcription dépendante d'ER vont dépendre des co-facteurs dont nous venons de voir les interactions et les fonctions. Ils vont agir dans des complexes multiprotéiques qui s'associent les uns avec les autres de façon dynamique et séquentielle dans le temps, permettant ainsi la mise en place de cycles successifs de transcription. Ci-dessous un modèle de ce roulement, adapté d'après Smith et O'Malley, 2004 et complété par certaines données de l'étude de Metivier et al, 2009. Il s'agit d'un modèle



d'expression génique qui montre comment les co-régulateurs interviennent pour activer un récepteur stéroïde tel qu'ER $\alpha$  lié a son ligand E2 sur le promoteur du gène *PS2* (Figure 26).



**Figure 26 Modélisation du mode d'action des co-facteurs.** L'association d'ER $\alpha$  avec E2 entraîne la liaison d'ER $\alpha$  avec l'ADN sur le promoteur de *PS2*. Un cycle initiateur de la transcription va se mettre en place : l'association E2-ER-Promoteur *PS2* est suivie par le recrutement de SWI-SNF qui va placer le nucléosome dans une position stable. Ensuite l'ER se lie aux méthyltransférases (HMT) qui vont dimétyler l'histone 4 (hélice verte) sur son arginine 3 (R3) et aux acétyltransférases (HAT) qui vont acétyler l'histone 3 (hélice bleue) sur sa lysine 14 (K14) (les hélices jaunes et rouges correspondent aux histones 1 et 2). A la fin de ce cycle initiateur, ER $\alpha$  est ensuite détaché du promoteur de *PS2* et ciblé vers le protéasome et des cycles dits de production vont pouvoir commencer. Le premier type de cycle de production va impliquer les HMT et les HAT qui vont entraîner de nouvelles modifications des histones avec l'acétylation par exemple de la lysine 16 (K16) de l'Histone 4. Et c'est à

partir de là que le promoteur va lier le mediator (TRAP/DRIP) qui va permettre l'association de la machine transcriptionnelle de base suivie de l'activation de la polymérase II (POLII) et de la synthèse d'ARNm. Le cycle va progresser jusqu'à une phase répressive où ER $\alpha$  est détaché du promoteur et l'action permissive des histones sera alors effacée par l'action des HDAC et des déméthylases des histones. Le complexe SWI/SNF est alors recruté pour remodeler la position du nucléosome afin que l'ERE soit à nouveau caché dans le corps de ce dernier. Le premier cycle productif est ainsi achevé mais il va retenir certains composants de la machine transcriptionnelle de base et certaines modifications comme par exemple la méthylation de l'histone 4. ER $\alpha$  va se lier à nouveau au promoteur de *PS2* et le deuxième cycle productif pourra alors se mettre en place (d'après Metivier et al, 2009).

## **2.6-Les modifications post-traductionnelles (MPT) des ERs**

*(d'après Poulard et al, 2010 et Le Romancer et al, 2011)*

Les modifications post-traductionnelles sont des modifications pour la plupart dynamiques qui confèrent aux ERs une grande capacité d'adaptation fonctionnelle. Elles sont à l'origine de relocalisations intra cellulaires et de changements conformationnels des ERs modulant leurs interactions avec leurs partenaires (Poulard et al, 2010).

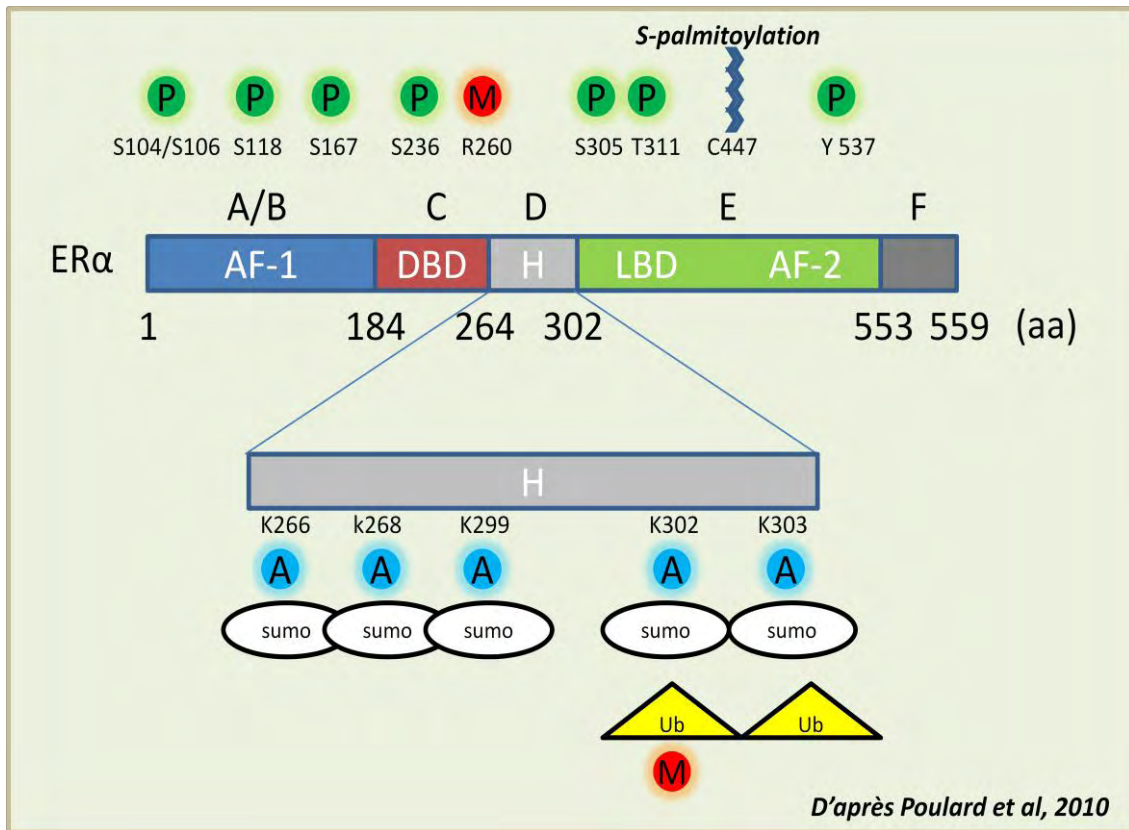
### **Modifications post traductionnelles d'ER $\alpha$ dans les voies d'activation génomique**

Les phosphorylations, acétylations, ubiquitinisations, sumoylations et méthylations sont des MPT impliquées dans la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . ER $\alpha$  contient de nombreux sites qui sont phosphorylés en réponse aux oestrogènes ou à d'autres hormones ou facteurs de croissance (Wang et al, 2002 ; Weitsman et al, 2006). Parmi les nombreux sites de phosphorylations (figure 27) nous citerons quelques exemples. La phosphorylation de la sérine 118 est une des mieux étudiée. Cette sérine se trouve au niveau de la fonction d'activation AF-1 d'ER $\alpha$  et peut être phosphorylée par de nombreuses kinases comme par exemple les MAPK en réponse aux oestrogènes, à la prolactine (Gonzalez et al, 2009) et aux facteurs de croissance EGF et IGF-1 (Kato et al, 1995). La phosphorylation de la sérine 236 par la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) va intervenir dans la dimérisation du récepteur (Chen et al, 1999) et la phosphorylation de la tyrosine 537 va réguler la fixation d'E2 sur ER $\alpha$  (Arnold et al, 1997). Enfin, la phosphorylation de la thréonine 311 par la p38-MAPK va inhiber l'export nucléaire d'ER $\alpha$ . L'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  va être réguler positivement ou négativement par les acétylations dépendantes de la protéine histone acétyltransférase p300. L'acétylation des lysines 266 et 268 va activer alors que l'acétylation des lysines 299, 302 et 303 va réprimer l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Wang et al, 2001).

Les lysines 302 et 303 sont aussi des cibles de la polyubiquitinylation régulant par ce moyen la stabilité d'ER $\alpha$  (Berry et al, 2008). Enfin, la lysine 302 est aussi un site de méthylation nécessaire à la stabilisation d'ER $\alpha$  au niveau des séquences régulatrices de ses gènes cibles (Subramanian et al, 2008). Toutes ces modifications post traductionnelles vont interagir les unes avec les autres afin de réguler les différentes étapes du cycle transcriptionnel d'ER $\alpha$ . Par exemple, la phosphorylation de la sérine 305 est nécessaire à l'activation de la phosphorylation de la sérine 118 et à l'inhibition de l'acétylation de la lysine 303, avec pour conséquence une action positive sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Cui et al, 2004). Ces MPT se présentent aussi comme des facteurs pronostiques ou comme des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes dans les carcinomes mammaires. En effet certaines de ces MPT sont dérégulées dans les carcinomes mammaires participant ainsi au développement des tumeurs. En terme de thérapeutique, le ciblage de ces modifications a été entrepris comme par exemple l'utilisation des inhibiteurs des histones déacétylases. Par ailleurs, des anticorps spécifiques dirigés contre certaines formes surexprimées sont à l'étude comme pour la phosphorylation de la sérine S118. D'autres MPT se présentent comme des marqueurs pronostiques de la réponse thérapeutique des carcinomes mammaires. Par exemple la phosphorylation des sérines S167 et S282 est un marqueur de bon pronostic au contraire de la phosphorylation de la sérine S305 qui apparait comme un facteur de mauvais pronostic. En effet sa phosphorylation induite par une hyperactivation de la PKA entraîne un changement conformationnel d'ER $\alpha$  qui lui permet de s'associer à SRC-1 en présence de Tamoxifène pouvant ainsi expliquer, dans ce cas, la résistance thérapeutique (Zwart et al, 2007).

## **Modifications post traductionnelles d'ER $\alpha$ dans les voies d'activation non génomique**

La palmitoylation est l'attachement de chaînes d'acides gras qui vont cibler les protéines vers des micro-domaines de la membrane plasmique, les cavéoles et les lipids rafts. ER $\alpha$  subit des cycles de palmitoylation et de dépalmitoylation qui permettent les mouvements de la protéine dans ces sous-domaines. La petite quantité d'ER $\alpha$  qui se trouve localisée à la membrane est palmitoylée sur la cystéine 447 du LBD par la palmitoyl acyl-transférase (PAT). Cette modification permet l'interaction d'ER $\alpha$  avec la cavéoline au niveau des cavéoles. Par ailleurs, il a été montré que la méthylation de l'arginine 260, localisée sur le DBD d'ER $\alpha$ , par l'arginine méthyl-transférase PRMT1 est essentielle à la formation d'un macrocomplexe qui contient ER $\alpha$ /SCR/PI3K et FAK (focal adhesion kinase) (Le Romancer et al, 2008).

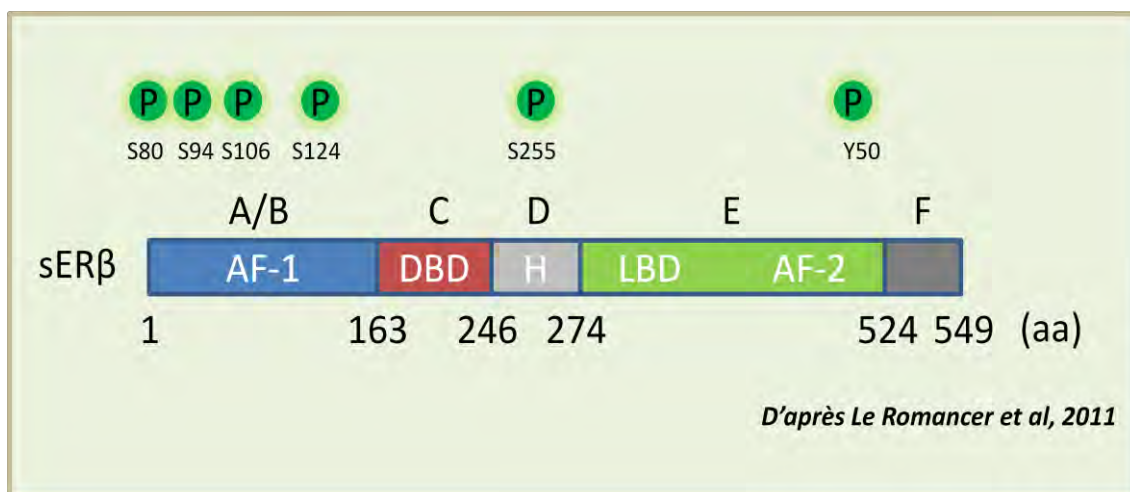


**Figure 27 Modifications post traductionnelles d'ER $\alpha$**  : le domaine A/B contient le domaine de transcription AF-1. Le domaine C contient le domaine de liaison à l'ADN. Le domaine D est la région charnière qui contient les séquences de localisation nucléaire. Le domaine E qui contient le domaine de liaison au ligand (LBD) et AF-2 qui active la transcription de façon oestrogéno dépendante. Le domaine F joue un rôle dans la spécificité du ligand. Sites des modifications d'ER $\alpha$ . M: méthylation ; P : phosphorylation ; A : acétylation ; Ub : ubiquitinylation ; Sumo : sumoylation (Poulard et al, 2010).

### Modifications post traductionnelles d'ER $\beta$

Les phosphorylations décrites ont pour la plupart été décrites chez la souris et les acides aminés correspondant chez l'homme sont donc indiqués dans le texte qui suit entre parenthèse. Il est suggéré que la phosphorylation des sérines S80 (S60) et S94 (S75) soit impliquée dans la stabilité d'ER $\beta$ . Les phosphorylations des sérines S106 (S87) et S124 (S105) par les MAPK favorisent le recrutement de SRC-1 et de CBP sur le domaine AF-1 d'ER $\beta$  et sont donc à l'origine de son activation. Les phosphorylations peuvent aussi être impliquées partiellement dans l'inhibition d'ER $\beta$  lié à E2 médié par Erb-B2/Erb-B3. Enfin la phosphorylation de la

Sérine S106 par les MAPK en réponse à CXCL12/SDF1 ligand du récepteur de la chimiokine CXCR4 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\beta$  et est impliquée dans le développement des cancers (figure 28). Comme ER $\alpha$ , ER $\beta$  est aussi localisé à la membrane par la palmitoylation, le plus probablement sur la cystéine C399. Au contraire d'ER $\alpha$  lié à E2, l'inhibition de la palmitoylation augmente sa liaison à la cavéoline-1. L'implication des MPT d'ER $\beta$  en carcinogénèse mammaire n'a pas encore été développée (Le Romancer et al, 2011).



**Figure 28 Modifications post traductionnelles d'ER $\beta$  chez la souris.** P : site de phosphorylation S: Sérine; Y : thyrosine

### **III-L'Inhibiteur d'Apoptose 5 : API5**

#### **1-Structure**

##### **1.1-Le gène *API5***

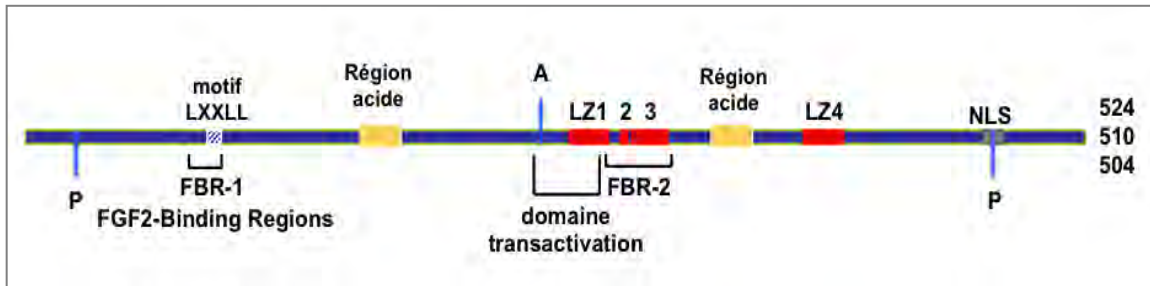
Le gène *API5* est localisé sur le chromosome 11 (11p11.2) et contient 15 exons (Gianfrancesco et al, 1999). La première étude caractérisant Api5 portait sur la recherche de facteurs de survie sur des lignées de cellules murines (Tewari et al, 1997). Ce travail a permis d'isoler deux ADN complémentaires (ADNc) codant pour deux formes de la protéine Api5, une courte et une longue, caractérisées à l'époque sous le nom de « AAC-11 short » et « AAC-11 long ». AAC-11 pour Anti-Apoptotic Clone-11. Dans la suite de ce travail notre équipe a montré par un crible double hybride chez la levure qu'Api5 était un partenaire du FGF2 (fibroblast growth factor -2) et il fut alors nommé FIF pour « *FGF2 Interacting Factor* » (Van den Berghe et al, 2000).

Le gène *API5* a un profil d'expression ubiquitaire. En effet, les analyses en Northern blot ont montré qu'Api5 était exprimé chez le rat, pendant la vie fœtale et lors du développement post natal précoce. (Tewari et al, 1997). De plus, chez l'adulte murin et humain, il a été détecté dans de nombreux organes et tissus (cœur, placenta, cerveau, poumon, foie, muscles squelettiques, pancréas, rein, rate et testicules) (Tewari et al, 1997; Van den Berghe et al, 2000).



## 1.2-La protéine Api5

### 1.2.1-Structure primaire



**Figure 29. Structures conservées de la protéine Api5** La protéine Api5 possède : un motif LXXLL (motif rayé), deux domaines de liaison au FGF2 (FBR-1 et 2), un domaine de transactivation, deux régions acides (boîtes jaunes), trois domaines "leucine zipper like" (LZ1, 2 et 3 boîtes rouges), un domaine "leucine zipper" canonique (LZ4 en rouge aussi) et une NLS (boîte grise). Un site de phosphorylation (P) et d'acétylation (A). Les trois isoformes de grande taille (de 524, 510 et 504aa) partagent les mêmes domaines protéiques.

La protéine Api5 contient (Figure 29) :

- un motif LXXLL (L102- L106), où L est une leucine et X n'importe quel acide aminé. Il est important de souligner, d'ores et déjà, dans le contexte de notre étude que la séquence LXXLL est une séquence caractéristique des protéines qui lient le domaine AF-2 des récepteurs nucléaires (Herry et al 1997) (cf chapitre sur les domaines d'interaction des ERs page 64). Il est à noter que ce domaine peut aussi participer à des liens inter-protéiques en dehors des récepteurs nucléaires (Plevin et al, 2005). Cependant, en ce qui concerne l'interaction entre Api5 et le FGF-2, ce motif, bien que présent dans la région d'interaction FBR1 (*FGF2 Binding Region*) avec le FGF-2 n'intervient pas dans cette liaison (Van den Berghe et al, 2000).

- Deux régions nécessaires à la liaison entre Api5 et le FGF-2: FBR1(résidus 96 à 107) et 2 (résidus 274 à 311) (Van den Berghe et al, 2000).

- Un domaine de transactivation (résidus 231 à 273) qui est masqué dans la protéine pleine taille (Van den Berghe et al, 2000) et dont l'activité n'a lieu qu'avec des constructions où la partie COOH terminale est éliminée. Néanmoins, d'après Van den berghe et al, 2000, ce domaine de transactivation pourrait devenir fonctionnel suite à des modifications post traductionnelles et/ou à des changements de conformation de la protéine qui le mettraient alors en évidence.

-Deux régions acides (résidus 161 à 190 et 323 à 335) qui sont des régions connues pour être liées à la fonction transactivatrice des facteurs de transcription.

- Trois domaines d' heptamère de leucine non canoniques "leucine zipper like" (résidus 259-287, 263-284 et 286-313) et un domaine d'heptamère de leucine canonique susceptible d'être un domaine "leucine zipper" (résidus 370 à 391).

- Un domaine de localisation nucléaire ou NLS pour « *Nuclear Localisation Sequence* », localisé en C-terminal (résidus 454 à 474) qui explique la localisation très majoritairement nucléaire d'Api5 (Van den Berghe et al, 2000).

## **1.2.2-Crystal de la protéine Api5**

### **Api5 est une protéine constituée d'une structure répétitive d'Hélices $\alpha$**

Le crystal de la protéine Api5 a été décrit récemment par Han et al en 2012. Il montre que le monomère d'Api 5 est constitué d'une structure répétitive d'Hélices  $\alpha$  qui forment une super hélice avec un pas à droite dont les dimensions sont de 100x35x50 Å (figure 30). Il s'agit de 19 hélices de type alpha, et de deux hélices de type 3<sup>10e</sup>. Chaque hélice est associée avec sa voisine et forme une paire d'hélices antiparallèles.

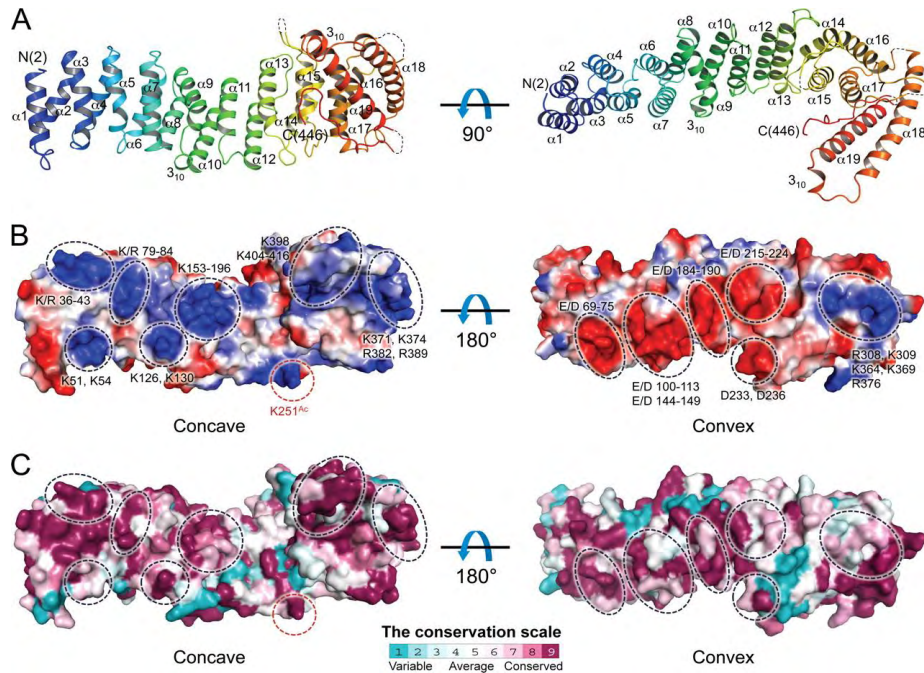
### **Api5 est une molécule qui expose des surfaces chargées**

Plusieurs parties de la molécule sont chargées positivement et se localisent dans les régions concaves de la surface d'Api5. Les parties chargées négativement se localisent dans les régions convexes. Ces surfaces sont très conservées dans de nombreuses espèces. La présence de ces régions chargées suggère de nombreuses possibilités d'interactions protéiques-protéiques pour Api5. Par exemple, en ce qui concerne le FGF-2 qui est chargé très positivement, il se lierait sur la face convexe négative d'Api5 au niveau des hélices  $\alpha$  6 et  $\alpha$  15-16.

### **Api5 est riche en motif répétitifs**

En ce qui concerne la région N terminale d'Api5, elle a la structure caractéristique des répétitions de type HEAT. La région C terminale, elle possède une structure répétitive mais de type ARM. Les structures de type HEAT et ARM sont elles aussi des structures connues pour leur capacité à créer des interactions protéines-protéines. De plus la structure allongée d'Api5 est particulièrement adaptée à un partenariat multiple (Tu et al, 2007).

### The overall structural representation of API5.



Han B et al. J. Biol. Chem. 2012;287:10727-10737

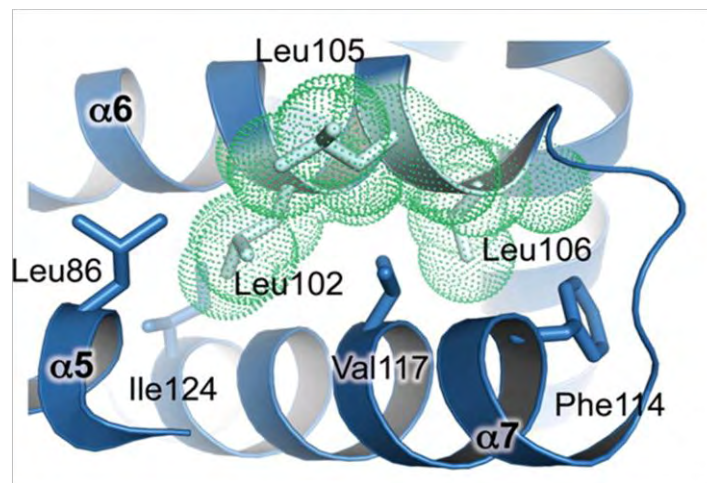
©2012 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology

*jbc*

**figure 30. Représentation de la structure générale d'Api5:** A, Le schéma représentant un ruban d'Api5 révèle sa structure allongée qui n'est composée que d'hélices  $\alpha$ . B, Les régions chargées d'Api5 : la région concave est très positive alors que la région convexe est chargée négativement. Les résidus acides et basiques sont indiqués. La lysine, Lys-251, est entourée d'un cercle rouge. L'exposition à des solvants permet son accès à des acétyltransférases ou à des déacétylases. C, Représentation de la surface de conservation des acides aminés. La surface de conservation a été faite via ConSurf (Ashkenazy et al, 2010).

### Le domaine LXXLL serait masqué dans le monomère d'Api5

La séquence LXXLL d'Api5 se trouve au niveau de l'hélice  $\alpha 6$  (figure 31, Han et al, 2012) et forme une hélice alpha amphipathique (à la fois hydrophile et hydrophobe). La séquence LXXLL d'après cette étude ne serait pas à la surface d'Api5 et ne pourraient donc pas intervenir dans une interaction protéine-protéine avec les récepteurs nucléaires. Cependant, les auteurs proposent que dans cette localisation les résidus leucines permettraient de stabiliser les motifs répétitifs HEAT en formant des liens hydrophobes avec les hélices  $\alpha$  de voisinage.



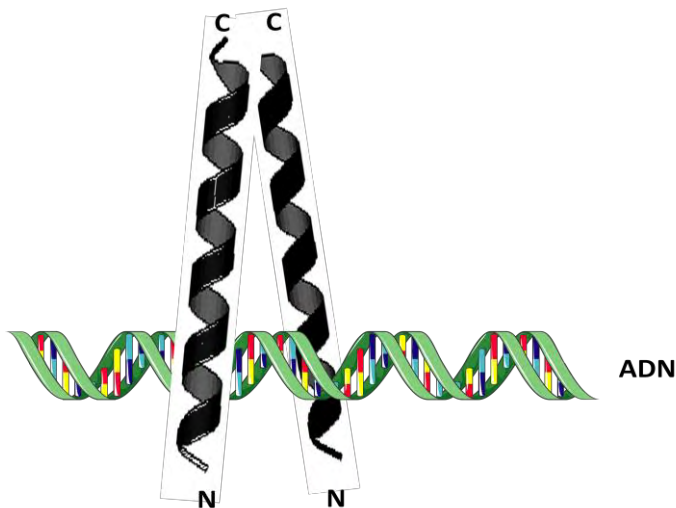
Han B et al. J. Biol. Chem. 2012;287:10727-10737

*jbc*

**Figure 31. Le motif LXXLL et ses résidus d'interaction.** Les résidus leucine interagissent avec les résidus hydrophobes sur les hélices adjacentes et sont impliqués dans la stabilisation de la structure répétée.

## **Le domaine "leucine zipper" canonique d'Api5 ne permettrait pas une liaison directe entre Api5 et l'ADN**

Les domaines "leucine zipper" sont fréquemment retrouvés au sein des domaines de liaison à l'ADN de différents facteurs de transcription comme par exemple pour fos et Jun et sont ainsi impliqués dans la régulation de l'expression de gènes (figure 32). Des régions basiques ont été retrouvées près du domaine "leucine zipper" canonique d'Api5. Cependant un domaine de liaison à l'ADN basique typiquement suivi d'un domaine "leucine zipper" tel qu'il est présent dans d'autres protéines possédant des domaines "leucine zipper" n'a pas été retrouvé pour Api5.

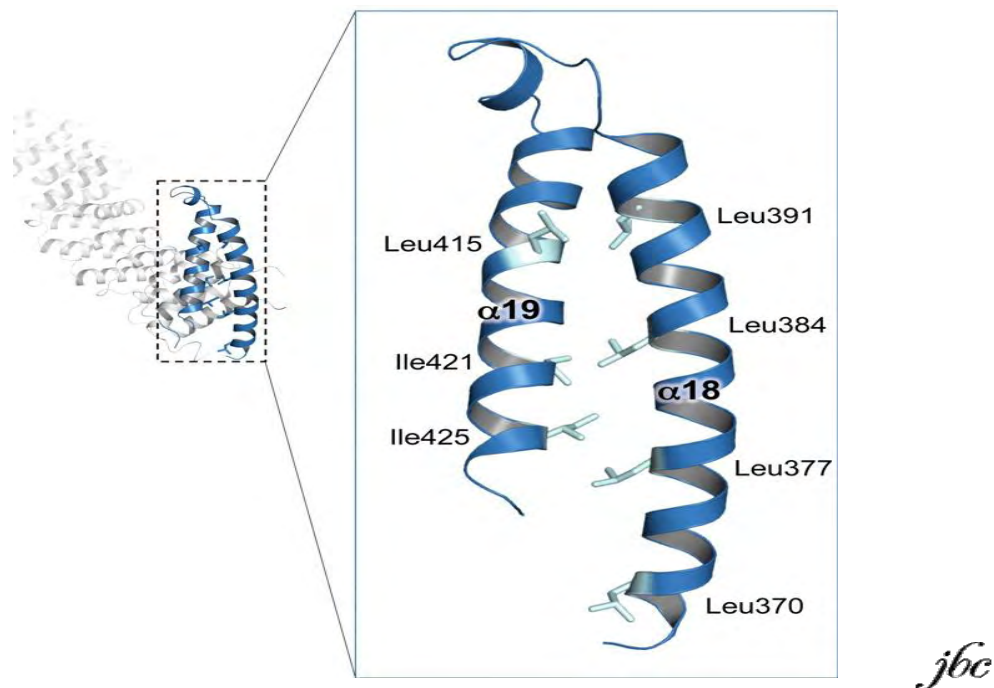


**Figure 32. Représentation schématique d'un domaine leucine zipper (hélices noires).** Les heptamères de leucines s'associent pour permettre la dimérisation des protéines les contenant et les domaines basiques adjacents permettent la liaison à l'ADN.

### **Le crystal d'Api5 est monomérique**

Le domaine leucine heptade canonique d'Api5 est prédictif d'une dimérisation d'Api5. Cependant le crystal d'Api5 est un monomère de 60.129 Da. Le domaine « leucine zipper » présumé qui se trouve sur  $\alpha 18$  n'interagit pas avec une autre sous-unité homologue. Au contraire d'après cette étude, il interagit avec  $\alpha 19$  de la même sous unité (figure 33). Trois des 4 leucines appartenant aux heptades présentent des interactions hydrophobes avec des résidus

hydrophobes de  $\alpha 19$ . C'est ainsi, que de façon inattendue, les auteurs montrent qu'Api5 est un monomère et que le domaine " leucine zipper " ne participe pas à sa dimérisation. Cependant, ils n'excluent pas qu'il s'hétérodimérise avec d'autres protéines contenant des structures leucines zipper dans certaines conditions comme c'est le cas pour la liaison entre Api5 et acinus.



Han B et al. J. Biol. Chem. 2012;287:10727-10737

**Figure 33 : Le motif répétitif leucine heptade.** L'hélice  $\alpha 18$  est recouverte par l'hélice  $\alpha 19$  de la même sous-unité et ne forme pas un motif "leucine zipper" typique. Les résidus leucines de la répétition en heptade et les résidus hydrophobes sur l'hélice  $\alpha 19$  sont proches les uns des autres. (Désignés par des bâtonnets).

Cette étude portant sur la structure protéique d'API5 montre qu'il possède des modules d'interaction protéine –protéine qui lui permettent de se lier avec de nombreux partenaires. Certains sont déjà connus tels que les FGF-2 (Van den Berghe, et al 2000), de haut poids moléculaire, acinus (Rigou et al, 2009), AIP1/2 (Li et al, 2011), et ALC1 (Ahel et

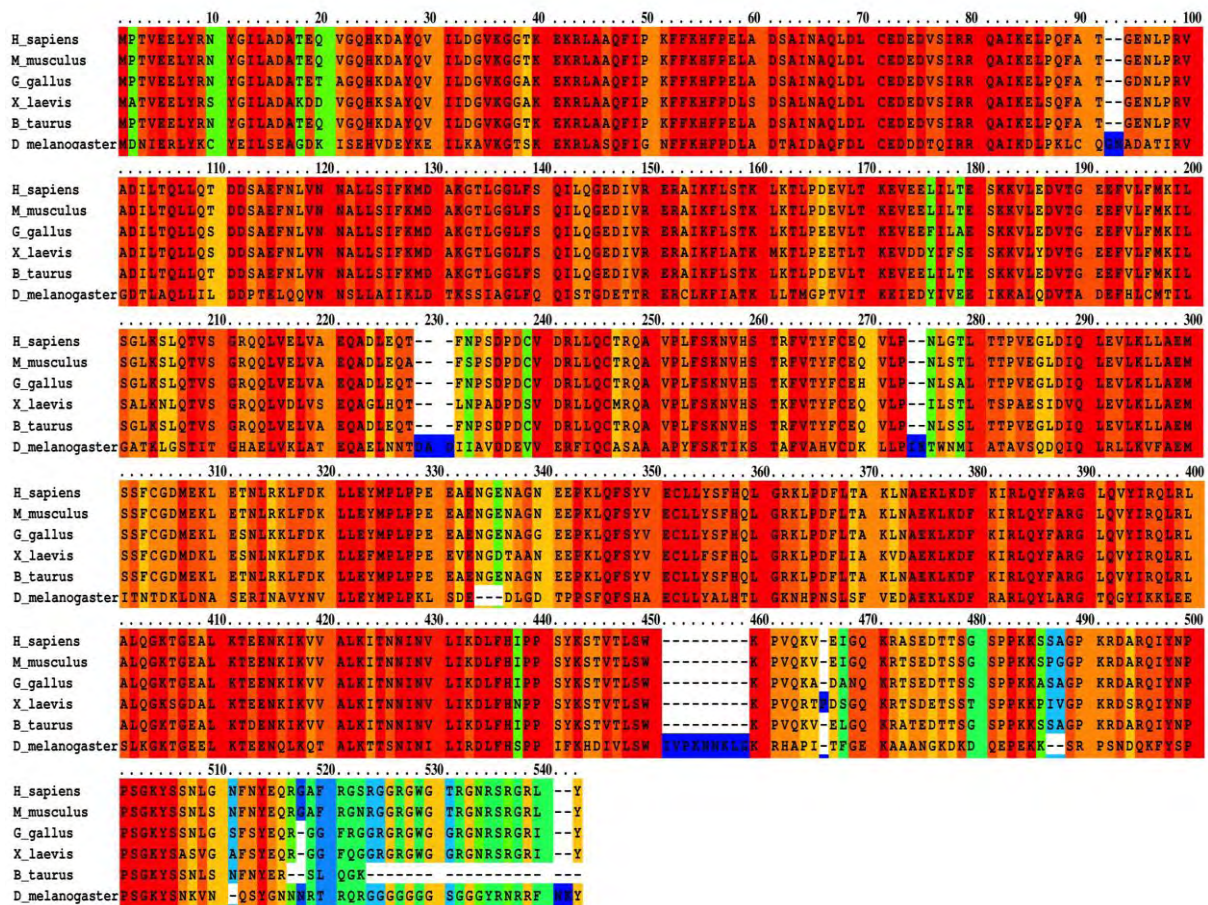
al, 2009). Api5 servirait ainsi d'échafaud pour des complexes multi protéiques lui permettant ainsi d'être impliqué dans différents complexes et dans différentes fonctions.

### **1.2.3-Les différentes isoformes et la conservation de la protéine Api5**

Chez l'homme il existe plusieurs isoformes d'Api5 contenant respectivement 524, 510, 504, 445 ou 331 aa. Ces différentes isoformes correspondent à des variations d'épissage portant sur les derniers exons de l'extrémité 3'. Concernant les formes de grande taille 524, 510 et 504, elles présentent les mêmes domaines protéiques et aucune différence fonctionnelle (Garcia-Jove Navarro 2011, résultats non publié). Chez la drosophile et le riz l'homologue d'Api5 utilisé dans leurs études correspond à une protéine de 536 aa. La protéine Api5 est une protéine très conservée au cours de l'évolution depuis les protistes jusqu'aux plantes et aux animaux (Li et al, 2011; Han et al, 2012). Cette importante conservation est en faveur d'un rôle fonctionnel majeur d'Api5 dans notre organisme (Figure 34).



Unconserved  Conserved



**Figure 34** Alignement de la séquence des acides aminés d'Api5 au cours de l'évolution.

Alignement *in silico* à l'aide du logiciel « PRALINE » des séquences protéiques d'Api5 de six différentes espèces (Simossis & Heringa, 2005). Du haut au bas : Homo sapiens (Api5 524aa), Mus musculus (Api5 524aa), Gallus gallus (Api5 524aa), Xenopus laevis (Api5 524aa), Bos taurus (Api5 504aa) et Drosophila melanogaster (Api5 536aa). L'échelle de couleurs indiquant la conservation des acides aminés apparaît en haut de l'alignement (résultat non publié de notre équipe réalisé par Marina Garcia-Jove Navarro 2011)

### **1.2.4-Génération de souris knockout Api5**

Un KO d'Api5 chez la souris a été réalisé dans notre équipe par Marina Garcia-Jove Navarro en 2011. Il nous a permis de montrer que la perte homozygote d'Api5 entraîne une létalité embryonnaire qui survient à des stades précoces de la gestation (avant E6). Le stade exact de la létalité et le phénotype des embryons homozygotes *API5* *-/-* n'ont pas été déterminés. Ce résultat souligne le caractère essentiel d'Api5 dans le maintien de l'intégrité génétique et dans l'embryogenèse et vient ainsi renforcer le caractère essentiel d'Api5 déjà indiqué par sa grande conservation au cours de l'évolution.

## **2-Régulations d'Api5**

### **Acétylation**

Une étude analytique de masse a montré que la lysine 251 d'Api5 est acétylée dans les cellules (Choudary et al, 2009). Or il est connu que l'acétylation d'une lysine sur une protéine peut affecter ses liens avec l'ADN et avec d'autres protéines (Yang X et al 2004). Han et al 2012 indiquent que la position de cette lysine au sein d'Api5 se situe sur une boucle entre  $\alpha$ 13 et  $\alpha$ 14 et la rend facilement accessible aux acétyltransférases et aux déacetylases. Ils montrent, par ailleurs, que l'acétylation d'Api5 n'affecte pas son interaction avec le FGF-2 ni sa localisation intra cellulaire. Par contre, l'activité anti-apoptotique d'Api5 est régulée négativement par l'acétylation de cette lysine sans qu'il y ait de changement structural. Les acétylases et les déacetylases qui régulent Api5 ne sont pas encore connues. Il se pourrait qu'Api5 soit régulé par certains inhibiteurs d'histones déacetylases.

## **Phosphorylations**

Api5 peut être phosphorylé sur les résidus tyrosine 28 et sérine 464 (Olsen et al, 2006). Il semblerait que la sérine 464 qui appartient au domaine NLS puisse être phosphorylée par la kinase CK1 (caseine kinase-1) et par les kinases Cdk1, Cdk2 et Cdk5 (Cdk pour Cyclin-dependent kinase) qui sont connues pour être impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Api5 est aussi une cible des kinases Pim (Peng et al, 2007) qui sont des proto-oncogènes régulant la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire.

## **Régulation par les œstrogènes**

Le récepteur aux œstrogènes est connu pour son rôle dans l'activation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes. Dans leur étude sur la signalisation du récepteur aux œstrogènes dans l'angiogénèse, Garmy-Susini et al 2004 ont montré que ce récepteur nucléaire régulait aussi l'expression d'Api5. En effet, ils ont montré que la stimulation du récepteur par des œstrogènes entraînait une accumulation de l'ARNm et de la protéine Api5.

## **Régulation par les micros ARN**

Récemment des études portant sur le rôle de certains micro ARN (miRNAs) dans les cancers ont montré qu'Api5 était une de leur cible.

Les miRNAs sont des ARN non codants qui régulent l'expression génique. Ils se lient à l'extrémité 3' non traduit de l'ARN messager et entraînent sa non traduction ou sa déstabilisation. Les miRNAs sont souvent dérégulés dans les inflammations et les cancers. Deux miRNAs ont été impliqués dans la régulation d'Api 5 : miR-143 (Pekow et al, 2012) et miR-224 (Scisciani et al, 2012 ; Wang et al, 2008 ; Fellenberg et al, 2012).

MiR-143 est considéré comme un suppresseur de tumeur. Il est régulé négativement dans les cancers sporadiques du côlon et dans la rectocolite ulcéro-hémorragique qui est une maladie inflammatoire chronique colique favorisant le développement des cancers du côlon. L'étude de Pekow et al, 2012, montre dans lignées cellulaires de cancer du côlon (HCA-7 et HCT116) que miR-143 régule négativement Api5. Ils confirment ces résultats in vivo en montrant, chez des patients atteints d'une rectocolite ulcéro-hémorragique, que miR-143 est régulé négativement alors qu'Api5 est à l'inverse régulé positivement par rapport à la cohorte saine.

Mir-224 est un miRNA qui est aussi connu pour réguler Api5. Plusieurs études que nous allons résumer montrent cette régulation.

Deux études montrent la régulation négative d'Api5 par mir-224 surexprimé dans des lignées d'hépatocarcinome et de cancer du côlon et in vivo dans des hépatocarcinomes. Dans une lignée d'hépatocarcinome HepG 2, ils montrent que lorsque miR-224 est surexprimé par des cytokines Api5 est inversement inhibé (Scisciani et al, 2012). Sur deux autres lignées cancéreuses, HCT-116 (côlon) et THLE-3(hépatique) ainsi que sur une série d'hépatocarcinomes, une autre étude montre que mir-224 était surexprimé alors qu' Api5 était bien inhibé (Wang et al, 2008). Par ailleurs dans la lignée HCT-116 ils observent une diminution de la viabilité cellulaire lors d'une surexpression exogène de miR224 qu'ils expliquent par l'inhibition d'Api5.

Dans une étude sur les tumeurs à cellules géantes (Fellenberg et al, 2012) des cellules stromales dérivées de ces tumeurs ont été identifiées comme étant la population néoplasique. Parmi cette population, une sous-population a été identifiée avec des caractéristiques communes à celles des cellules souches mésenchymateuses. L'hypothèse, serait que ces cellules stromales néoplasiques dériveraient des cellules souches mésenchymateuses. Afin de développer leur hypothèse les auteurs ont donc comparé dans ces deux populations, stromale

néoplasique et mésenchymateuse souche, l'expression de 26 miRNA dont miR-224 et de leurs gènes cibles. En accord avec leur proposition, seuls 3% des gènes montraient une différence significative d'expression entre les deux populations. Parmi les 3% de gènes différentiellement exprimés, Mir 224 était le gène qui présentait la plus grande différence d'expression. Dans les tumeurs à cellules géantes et dans les cellules stromales dérivées, miR-224 est inhibé par rapport aux cellules souches et Api5 est à l'inverse surexprimé.

Une étude encore plus récente (Di Leva G et al, 2013) montre que miR-191/425 est régulé par le 17- $\beta$ -oestradiol et par le récepteur aux œstrogènes. L'analyse du profil d'expression génique d'une lignée de cancer du sein MDA-MB-231 (récepteur aux œstrogènes négatives) transfectée ou non par miR-191/425 montre une dérégulation de 1858 gènes. Par qRT-PCR dans la lignée MDA-MB-231 les auteurs ont vérifié la dérégulation de 20 gènes parmi les 1858. D'après les dérégulations observées et tenant compte de la fonction des gènes analysés, ils concluent que miR-191/425 possède une action globale anti-tumorale et parmi les gènes analysés se trouve Api5 dont l'expression est inhibée par miR-191/425.

## **3-Les Fonctions d'Api5**

### **3.1-Api5 et Apoptose**

#### **Premières études proposant Api5 en tant que facteur anti-apoptotique**

C'est à partir d'une banque d'ADNc de fibroblastes murins BALB/3T3 soumise à une déprivation de sérum que Tewari et al, 1997, ont mis en évidence une forme courte d'Api5 appelée alors AAC-11 short de 230 aa (1023-bp). Cette forme courte conférait aux cellules une survie au delà de 6 semaines de traitement sans sérum alors que les autres colonies mourraient au bout de deux semaines. Dans la même banque ils ont ensuite identifié une isoforme plus longue de 504aa et de 3714-bp présentant 90% d'homologie avec un cDNA humain qui était celui d'Api5. Dans cette étude la présence du motif "leucine zipper" d'AAC-11 short était nécessaire pour ses propriétés anti-apoptotiques. Par ailleurs, les auteurs ont observé qu'AAC-11 short était en compétition avec l'activité AP-1 in vitro et in vivo, qui lui aussi possède un motif "leucine zipper". Ils ont donc proposé que la compétition entre AAC-11 short et AP-1 empêche l'apoptose induite par AP-1 et de manière plus générale qu'Api5 soit un nouveau compétiteur de la transactivation de gènes par des facteurs de transcription contenant un domaine "leucine zipper".

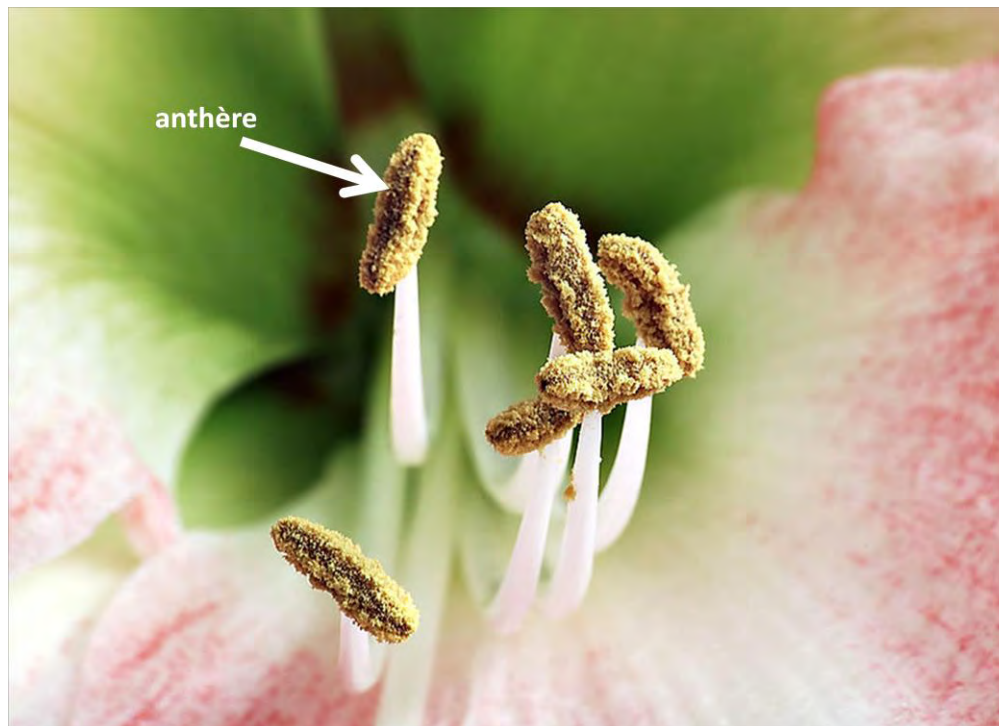
Un autre travail concernant la survie cellulaire d'une lignée de cancer du col de l'utérus, CUMC-6, a montré que dans un milieu sans sérum la surexpression d'Api5 conférait aux cellules une survie plus longue (8 semaines vs. 4 semaines pour le contrôle) (Kim et al, 2000).

## Un homologue d'Api5 chez le riz (*Oryza sativa*) pro-apoptotique

*d'après Li X et al, 2011*

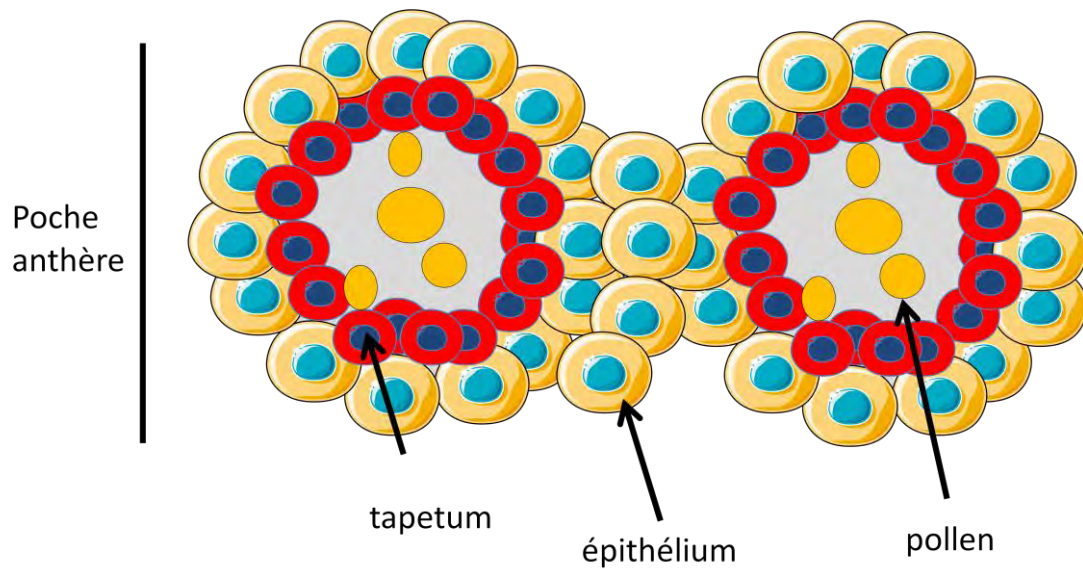
A l'inverse des études qui suivront chez les animaux et chez l'homme, Api5 se présente chez la plante comme un facteur pro-apoptotique. Chez les plantes, Api5 est exprimé de façon très ubiquitaire. En ce qui concerne le riz (*Oryza sativa*) c'est au niveau du tapetum qu'il est le plus exprimé. Le tapetum correspond aux cellules de soutien qui bordent la paroi interne de l'anthere. L'anthere représente l'organe reproducteur mâle des plantes et a pour fonction de contenir le pollen, de le nourrir et ainsi de permettre son développement (figure 35).

A





B



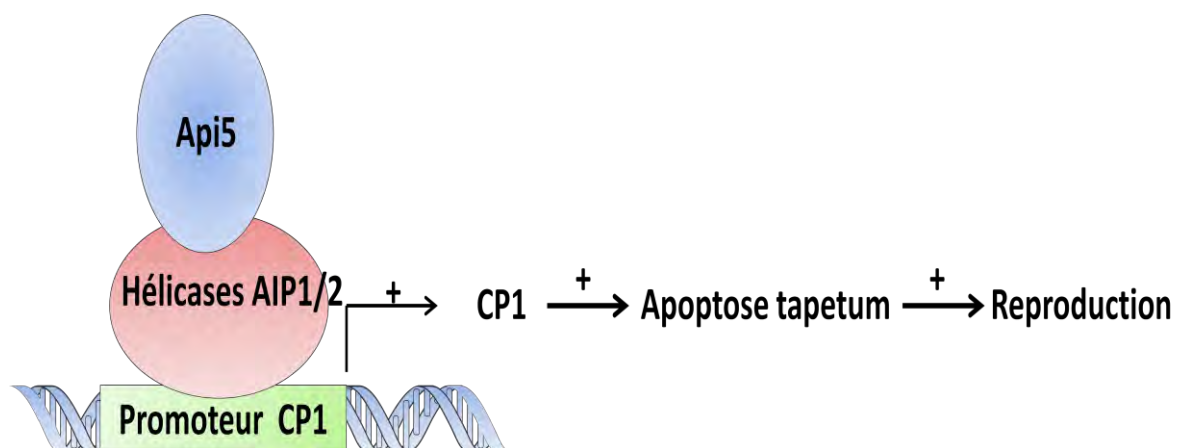
**Figure 35. A. Photographie des anthères d'une fleur B. Représentation schématique des anthères d'une fleur en coupe transversale.** L'anthère est composée de plusieurs poches bordées par un épithélium recouvert sur sa face interne par des cellules constituant le tapetum. Les poches contiennent et nourrissent le pollen en développement.

Li X et al, 2011 ont montré que la déplétion d'Api5 était à l'origine d'un retard de la dégénérescence de ce tapetum. Or cette dégénérescence qui résulte d'une apoptose est un phénomène nécessaire qui permet la nutrition des gamètes. Dans cette étude les plantes, KO pour Api5, présentent un développement et une floraison quasiment similaire à ceux des plantes sauvages. Seul l'anthère est plus petit que celui des types sauvages, et le pollen (gamète mâle), n'est pas développé, avec des membranes plissées, vides, sans glucose et ne permettant donc pas de féconder les gamètes femelles.

Au niveau moléculaire les auteurs montrent qu'Api5 interagit avec AIP1 et AIP2 (Api5- interacting-protéine 1 et 2) qui sont des ARN hélicases DEAD box ATP dépendantes. Or ces hélicases « Dead Box » sont connues pour être impliquées dans la réponse au stress et dans le développement chez la plante. Chez l'animal, elles sont impliquées dans tout le métabolisme des ARNm, transcription, épissage, et transport (De la Cruz et al, 1999; Rocak S



et al, 2004). Dans cette étude l'inhibition de ces deux hélicases, donne le même profil que le KO d'Api5 avec un retard de dégénération du tapetum, des microspores irrégulières et en conséquence une stérilité. De plus l'inhibition d'Api5 et d'AIP1/2 est à l'origine de la décroissance d'une protéase à cystéine impliquée dans l'apoptose nommée CP1 (cysteine protéase-1). CP1 étant également à l'origine d'un développement anormal du pollen et d'une stérilité. Dans cette étude seul AIP1/2 régule CP1 directement sur son promoteur. Api5 participerait donc à un complexe transcriptionnel dans lequel il interagirait directement avec AIP1/2 pour réguler l'expression de CP1, lui même exécutant le processus apoptotique permettant le développement du pollen et la reproduction de la plante (figure 36).



**Figure 36. Représentation schématique du complexe transcriptionnel impliquant AIP1/2 et Api5 à l'origine de la régulation positive de CP1 acteur de l'apoptose du tapetum.** Cette apoptose est nécessaire pour la nutrition du pollen et donc pour assurer son développement afin que la plante puisse se reproduire.

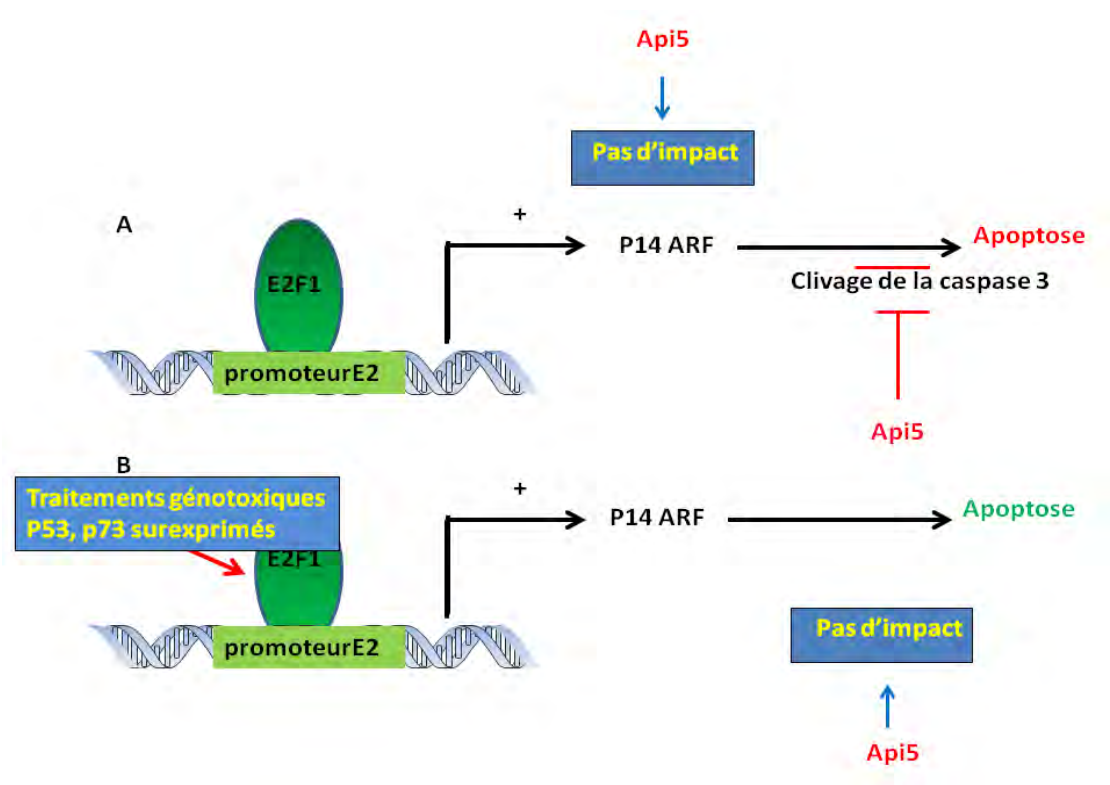
Dans les études qui vont suivre Api5 se présente en tant qu'un facteur anti-apoptotique majeur.

## **Identification fonctionnelle d'Api5 comme suppresseur de l'apoptose induite par E2F1 chez la Drosophile**

*D'après Morris et al, 2006*

Le bon développement des organismes repose sur un équilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose. Les protéines E2F (E2-promoter binding factor) sont des facteurs qui participent à ces deux fonctions majeures. Ainsi ces protéines sont des régulateurs positifs incontournables de la progression du cycle cellulaire. Parallèlement à cette action et afin de contrôler la prolifération cellulaire induite, les protéines E2F sont aussi des inducteurs de l'apoptose. L'induction de l'apoptose leur permettra donc dans certains cas de limiter une dérégulation de la prolifération. Lorsque l'ADN est endommagé, E2F1 est un des facteurs de transcription dont l'activation va être à l'origine de la transcription de nombreux régulateurs pro-apoptotiques. Afin d'étudier les facteurs à l'origine de l'activité apoptotique d'E2F1, Morris et al 2006 ont mis en place un crible génétique *in vivo*, chez la Drosophile. Ils ont premièrement généré une lignée de drosophiles transgéniques surexprimant E2F1 (dE2F1) sous un promoteur *Actin 88F* fonctionnant pendant le développement. Le résultat de la surexpression de dE2F1 dans ces drosophiles transgéniques présentait un phénotype anormal des ailes qui était la conséquence d'une apoptose accrue. La co-expression du facteur de transcription RBF1, homologue de pRb humain (protéine du rétinoblastome humaine), qui régule négativement dE2F1 chez la drosophile annulait le phénotype anormal des ailes. Ils ont ensuite inséré de façon aléatoire un élément transposable P dans le génome des drosophiles transgéniques (*Actin 88F/dE2F1*). C'est ainsi que le gène *Api5* a été ainsi mis en évidence car son invalidation était à l'origine d'un phénotype apoptotique accru au niveau des ailes des mouches. Les résultats observés ont ensuite été confirmés *in vitro* sur une lignée cellulaire de drosophile. Dans cette lignée l'apoptose induite par une surexpression d'E2F1 était augmentée par l'inhibition de l'expression d'Api5. Les auteurs ont ensuite confirmé ces

résultats chez l'homme sur une lignée d'ostéosarcome Saos-2 (figure 37 A). Dans cette lignée humaine la stimulation de l'expression de p14<sup>ARF</sup> et de la Cycline E par E2F1, dont ils sont des cibles transcriptionnelles, n'étaient pas perturbées par l'inhibition de l'expression d'Api5 (figure 37 A). Par contre, l'expression d'Api5 était à l'origine d'une diminution du clivage de la caspase -3 et de la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) qui sont des intermédiaires de l'apoptose induite par E2F1 (figure 37A). En conséquence de ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'apoptose médiée par E2F1 était inhibée par Api5 en aval de l'activité transcriptionnelle d'E2F1. Enfin, la surexpression d'Api5 dans la lignée Saos-2 était insuffisante pour protéger les cellules d'une apoptose induite par des traitements chimiques ou par la surexpression de p53 et p73 (figure 37 B).



**Figure 37. Représentation schématique de l'action transcriptionnelle d'E2F1 dans la lignée humaine d'ostéosarcome Saos-2.** A, B Api5 n'a pas d'impact sur l'activité transcriptionnelle d'E2F1 sur le promoteur de p14<sup>ARF</sup>. A : Api5 inhibe l'apoptose induite par E2F1 en aval de son action transcriptionnelle en empêchant, en outre, le clivage de la caspase 3. B : Api5 n'est pas capable de protéger la cellule de l'apoptose induite par E2F1 lorsque celle-ci est induite par des traitements génotoxiques ou une surexpression de p53 ou de p73.

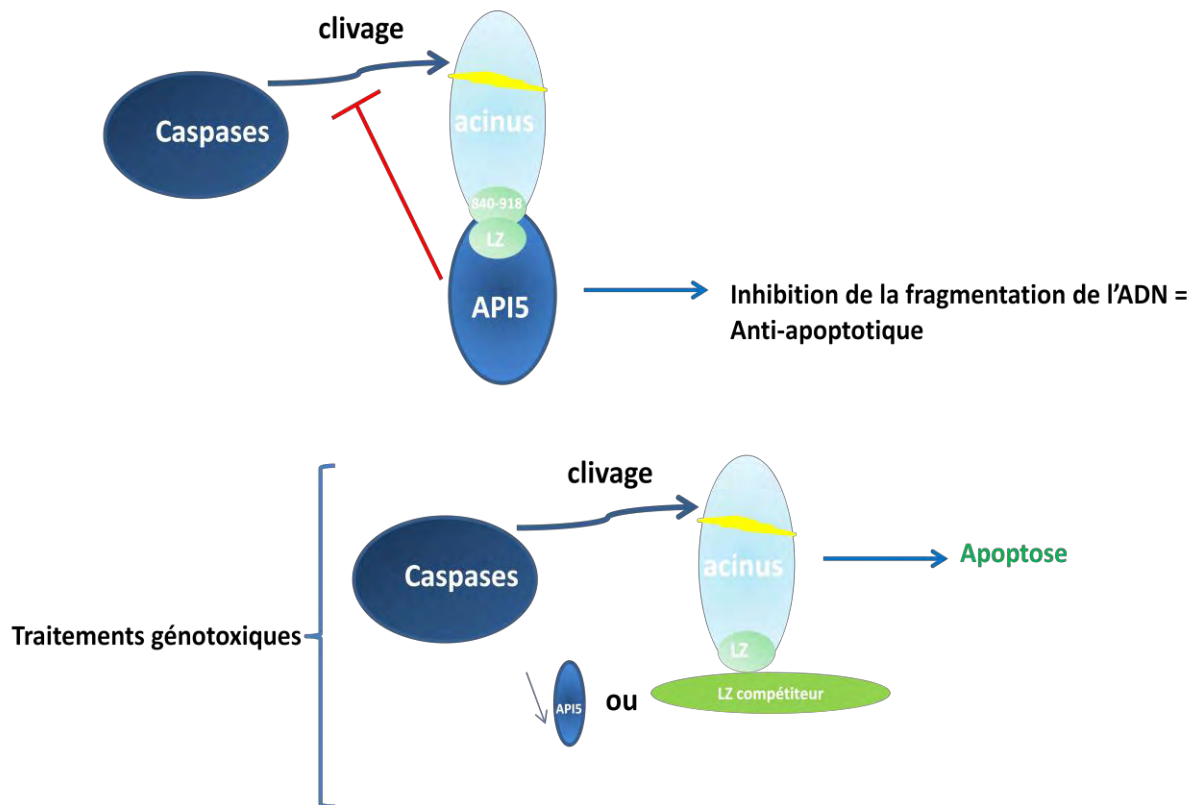
## **Api5 inhibe la fragmentation de l'ADN induite par acinus**

*d'après Rigou et al, 2009*

Lors de l'apoptose on observe une condensation et une fragmentation de la chromatine ainsi qu'une convulsion des membranes cytoplasmiques et nucléaires et une condensation du cytoplasme. Au niveau moléculaire, la signalisation de l'apoptose induit l'activation des caspases, une famille de protéases à cystéine. Le clivage de cibles spécifiques par les caspases activées conduit ainsi à l'autodestruction de la cellule. Acinus est un facteur nucléaire clivé par les caspases qui a été impliqué dans le phénomène de condensation chromatinienne. (Sahara et al, 1999). Dans leur étude à la recherche de partenaires d'Api5, Rigou P et al, 2009 ont identifié acinus à partir d'un crible double hybride effectué chez la levure. Ils ont montré, dans une lignée d'ostéosarcome humain, U2OS, que la liaison d'Api5 à acinus, le protégeait du clivage par la caspase 3 induisant dans cette étude non pas un arrêt de la condensation mais un arrêt de la fragmentation de l'ADN (figure 38 haut). A l'inverse, la déplétion d'Api 5 est à l'origine d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN et d'un clivage important d'acinus. Ils montrent également que le domaine "leucine zipper" d'Api5 permet son oligomérisation et son interaction directe avec acinus (figure 38 haut) ainsi que son effet anti-apoptotique. Par ailleurs dans cette étude les auteurs montrent qu'Api5 n'affecte pas la voie des caspases et donc que son effet anti-apoptotique est le plus probablement lié de façon spécifique à acinus.

De plus, toujours dans le même modèle cellulaire, U2OS, ils montrent que la déplétion d'Api5 est à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements génotoxiques par l'étoposide et la camptothécine, (figure 38 bas) mais pas à des traitements par le cisplatine, le paclitaxel et le 5-fluorouracile. Cette sensibilisation à l'apoptose s'accompagne d'une augmentation de l'activité des caspases effectrices-7/3. Api5

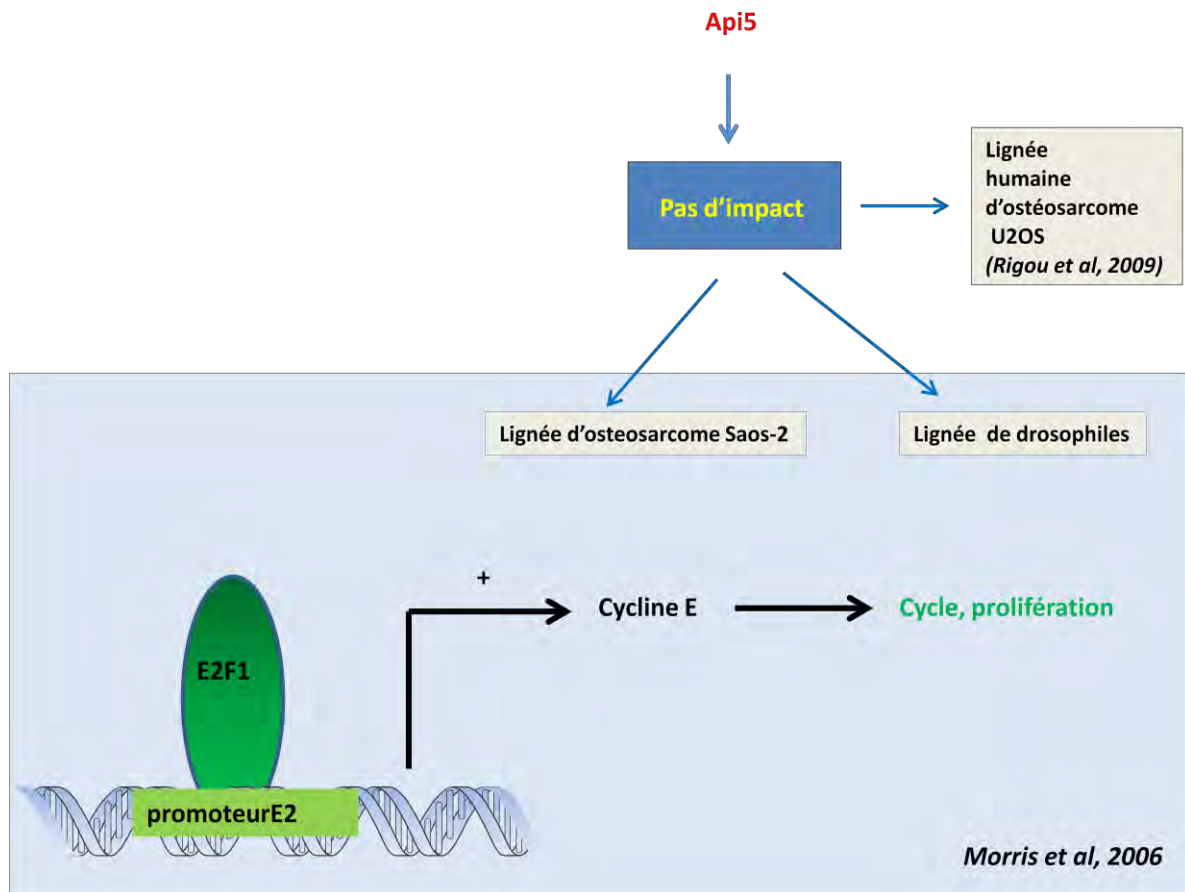
paraît donc, suite à cette étude, une cible thérapeutique intéressante pouvant sensibiliser les cellules aux agents anticancéreux. Les auteurs de cette étude ont ainsi conçu et produit un peptide pouvant pénétrer dans les cellules et qui couvre le domaine leucine zipper (LZ) d'Api5, en fusion avec une NLS pour inhiber l'oligomérisation LZ dépendante d'Api5. Des essais d'immunoprécipitation en présence de ce peptide (et d'un mutant ponctuel de celui-ci) ont permis de démontrer l'efficacité de ce peptide dans la compétition de l'interaction LZ-LZ des protéines Api5 entre elles. De plus, ce peptide est capable de rompre l'interaction d'Api5 avec Acinus. Enfin, la fragmentation de l'ADN suite à l'exposition des cellules à des facteurs pro-apoptotiques (absence de sérum, traitement génotoxique, surexpression d'E2F1) est nettement augmentée lorsque les cellules ont été pré-incubées avec le peptide LZ sauvage. Ces résultats permettent de conclure que le peptide LZ est capable de sensibiliser les cellules cancéreuses aux traitements génotoxiques ce qui permet d'envisager une application thérapeutique de cette approche (Faye et Poyet, 2010).



**Figure 38 Représentation schématique de l'action d'Api5 sur l'apoptose induite par acinus.** Haut : Le domaine, LZ : "leucine zipper" d'Api5 lie la région 840-918 aa d'acinus. Cette liaison protège acinus du clivage par les caspases. la fragmentation de l'ADN dépendante de ce clivage est inhibée. Bas : la déplétion d'Api5 ou l'introduction d'un facteur compétiteur possédant un domaine "leucine zipper" permettra, à l'inverse, l'action d'acinus et donc l'apoptose.

### 3.2-Api5, la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire

Il existe peu d'études sur l'implication d'Api5 dans la prolifération et le cycle cellulaire. Les études de Morris et al, 2006 et Rigou et al, 2009 qui ont étudié cette fonction dans des lignées de drosophiles et d'ostéosarcome ne montrent pas d'impact d'Api5 sur le cycle et la prolifération (Figure 39).

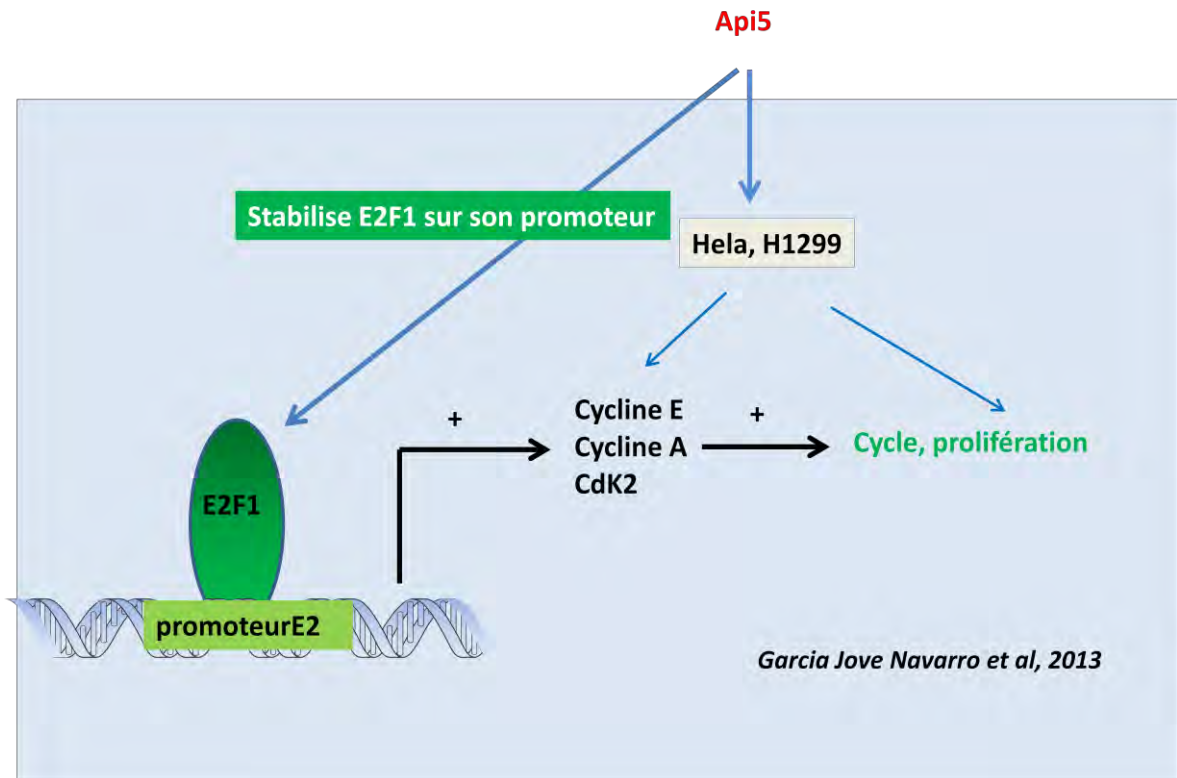


**Figure 39.** L'expression d'Api5 n'a pas d'impact sur le cycle et la prolifération dans les lignées de drosophiles et d'ostéosarcomes humains Saos-2 (Morris et al 2006) et U2OS (Rigou et al, 2009).

Cependant, dans notre équipe, Garcia-Jove Navarro M et al, 2013, ont, en raison du rôle primordial que joue E2F1 dans la prolifération et le cycle cellulaire ainsi que des relations connues entre Api5 et E2F1 dans le cadre de la fonction apoptotique d'E2F1 (Morris et al, 2006), étudié à nouveau l'impact d'Api5 sur le cycle cellulaire et la prolifération régulés par E2F1 sur de nouvelles lignées. Elle a montré sur une lignée humaine de cancer du poumon

(H1299) et sur une lignée de cancer du col de l'utérus (Hela) que l'expression d'Api5 variait périodiquement pendant le cycle cellulaire. La variation observée était similaire à celle d'E2F1 avec un pic d'expression en fin de phase G1 et en début de phase S. Son niveau d'expression diminuant en phase G2 et M. De plus, la déplétion d'Api5 était à l'origine d'une accumulation des cellules en G1 et d'un ralentissement de la prolifération cellulaire. Elle montre également qu'Api5 régule positivement l'expression de gènes impliqués dans la transition G1/S et également connus pour être transactivés par E2F1. En effet la déplétion d'Api5 par des si RNA dans des cellules Hela est à l'origine d'une diminution de l'expression des cyclines A, E et de Cdk2. L'expression d'E2F1 reste inchangée. Ils ont également montré que la liaison d'E2F1 sur des promoteurs cibles (SKP2, cycline E et E2F1 lui-même) est potentialisée par la surexpression d'Api5 et inhibée par sa déplétion (figure 40). De façon étonnante Api5 n'interagit pas physiquement directement ou indirectement avec E2F1. En conséquence Api5 et E2F1 n'appartenant pas au même complexe protéique cela implique que la régulation de la transcription d'E2F1 se fasse par l'intermédiaire d'un autre gène encore méconnu dont la transcription serait régulée directement par Api5 et dont le produit potentialiserait la liaison d'E2F1 avec certaines de ses cibles. Dans cette étude nous avons aussi montré par des extractions au chlorure de sodium qu'Api5 était un facteur associé à la chromatine *in vivo*.



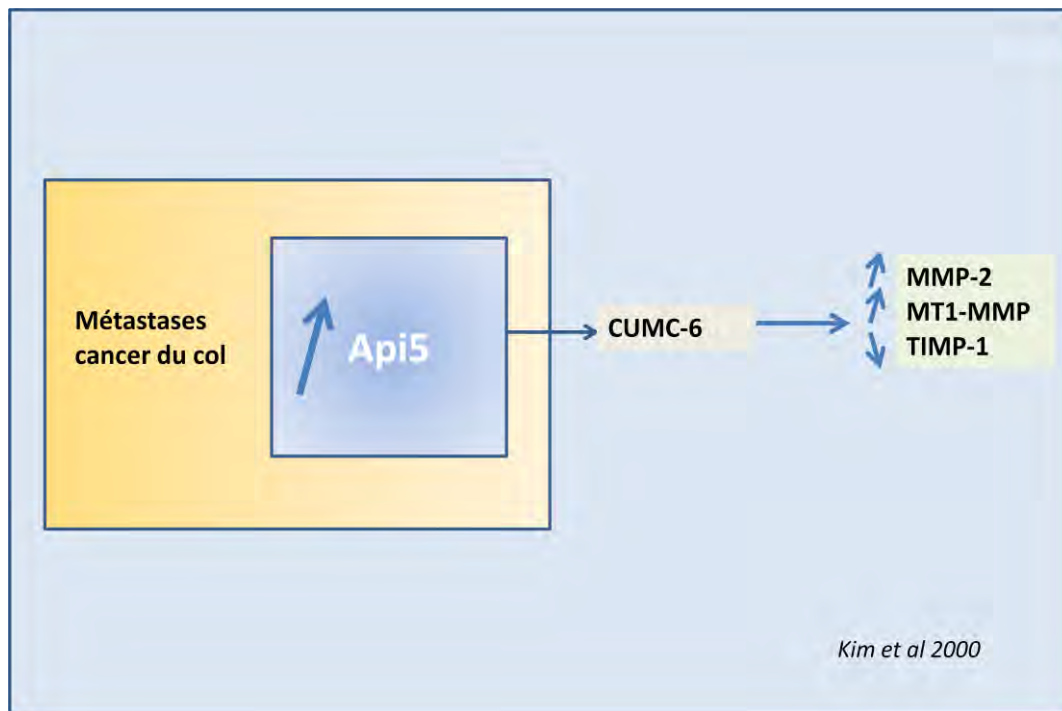


**Figure. 40** Représentation schématique des actions d'Api5 sur la transcription dépendante d'E2F1 dans les lignées HeLa et H1299. Api5 stabilise E2F1 sur son promoteur, il régule positivement des gènes cibles d'E2F1 : cycline E, A et Cdk2 et agit positivement sur le déroulement du cycle cellulaire et sur la prolifération

### 3.3-Api5, migration et invasion

L'étude de Kim et al 2000, cherchant à identifier des gènes associés au cancer du col de l'utérus humain, a observé que dans ces carcinomes l'ARNm d'Api5 est plus fortement exprimé dans les métastases des ganglions lymphatiques (n=3) que dans les tumeurs primaires (n=9) et les tissus sains (n=9). Dans cette étude, les auteurs ont aussi établi des lignées stables CUMC-6 de cancer du col de l'utérus surexprimant l'isoforme humaine de 524 aa d'Api5. La surexpression d'Api5 dans ces lignées augmente l'expression des transcrits des métalloprotéases MMP-2 (métalloprotéases matricielles-2) et MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase 1), qui ont été par ailleurs corrélées au phénotype invasif de tumeurs (Tryggvason K et al, 1993) et inhibe l'expression de TIMP-1 (metallopeptidase inhibitor-1),

une protéine inhibitrice des métalloprotéases, considéré comme un suppresseur de tumeurs (figure 41). D'après les auteurs, la surexpression d'Api5 conférerait, aux cellules une plus grande capacité d'invasion et d'adhésion.

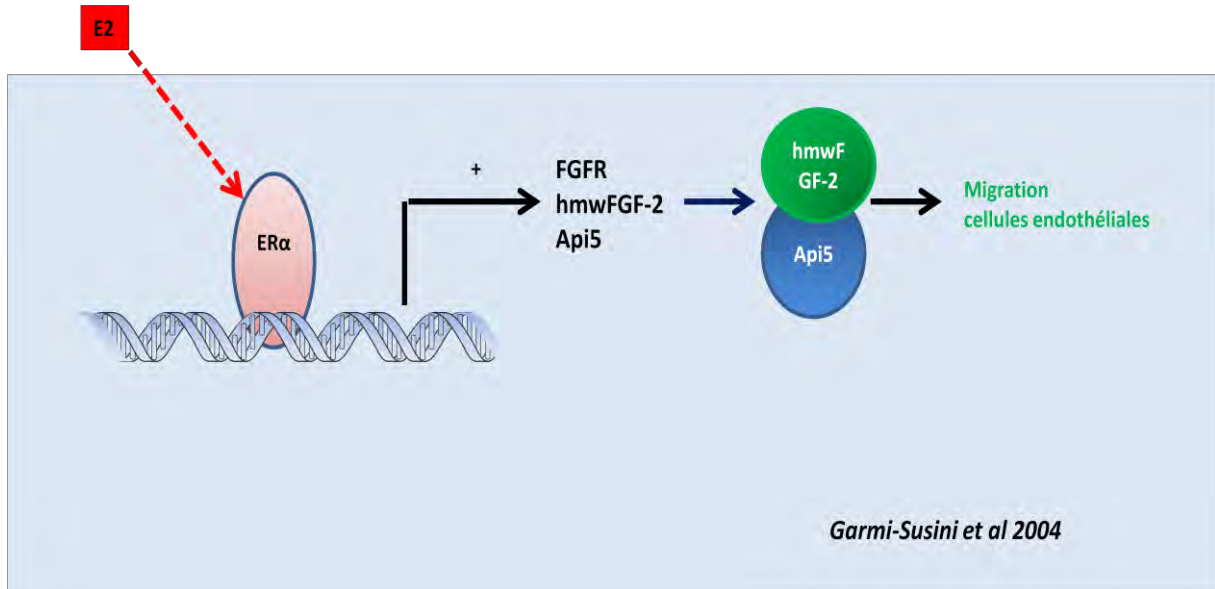


**Figure 41. Impact d'Api5 sur la migration et sur l'invasion des cancers du col**

Api5 est surexprimé dans les métastases de cancer du col par rapport à la tumeur primitive. De plus la surexpression d'Api5 dans une lignée de cancer du col CUMC-6 régule positivement la transcription des MMP-2, de MT1-MMP et négativement TIMP-1.

Une étude antérieure avait déjà montré qu'Api5 jouait un rôle dans la migration des cellules. Il s'agissait d'une étude sur le rôle des hmw (high molecular weight) -FGF2 dans l'angiogénèse dépendante des oestrogènes (Garmy-Susini et al, 2004). Les œstrogènes ont été décrits comme des facteurs pro-angiogéniques notamment parce qu'ils stimulent la migration et la prolifération des cellules endothéliales. L'effet angiogénique de ces hormones passant par la signalisation d'ER $\alpha$ . Dans cette étude les auteurs ont observé que les œstrogènes régulent positivement l'expression des récepteurs aux FGFs, des hmw-FGF2 et d'Api5

(Figure 42). La suppression partielle d'Api5, en utilisant des siRNAs, atténue les effets des œstrogènes sur la migration des cellules endothéliales FGF2<sup>+/+</sup> et les abolit complètement lorsque les cellules n'expriment que les hmwFGF-2 (1mwFGF2<sup>-/-</sup>). La migration des cellules endothéliales sous l'effet des œstrogènes passe donc par les hmwFGF2 et par Api5.



**Figure 42. Rôle d'Api5 et ses partenaires hmwFGF-2 dans la migration des cellules endothéliales dépendante de la signalisation médié par E2-ERα.** La stimulation de l'ERα par E2 est à l'origine d'une augmentation de l'expression des récepteurs au FGF-2 (FGFR) des hmwFGF-2 et d'Api5. Api5 et hmwFGF-2 sont nécessaires à la prolifération des cellules endothéliales dépendantes d'E2-ERα.

Plus récemment Rigou et al 2009 ont montré dans leur étude sur des U2OS d'ostéosarcome que l'incubation de ces cellules avec un peptide compétiteur de l'interaction LZ-LZ de la protéine Api5 était là encore à l'origine d'une diminution de la mobilité et de l'invasion des cellules U2OS.

## **4-Les implications d'Api5 en pathologie cancéreuse**

Les quelques études menées jusqu'à présent sur Api5, présentent cette protéine comme un facteur favorisant le développement tumoral. Elles montrent qu'Api5 s'exprime dans différentes lignées cellulaires provenant de cancers d'origine variée (carcinome, sarcome, mélanome, leucémies). Les rares études faites à partir de tissus cancéreux humains ont été effectuées en grande majorité sur des carcinomes.

Deux études ont étudié l'expression de l'ARNm d'Api5. Une étude dont nous avons déjà parlé dans le chapitre sur la migration et l'invasion concernant le cancer du col (Kim et al, 2000 voir chapitre sur la migration) a suggéré une implication positive d'Api5 dans le processus métastatique. La deuxième étude concerne le cancer du poumon non à petites cellules (Sasaki et al, 2001). Cette étude (n=94) a montré une corrélation entre l'expression de l'ARNm d'Api5 (n=12) et une faible survie. Ils ont également retrouvé une expression plus fréquente d'Api5 dans les cancers épidermoïdes que dans les adénocarcinomes. Par ailleurs, ils n'ont pas trouvé de corrélation entre l'expression d'Api5, la taille tumorale et la présence de métastases ganglionnaires. Les auteurs concluent que la présence d'Api5 est un marqueur de mauvais pronostic dans les cancers du poumon non à petites cellules.

D'autres études, ont analysé l'expression par Western Blot de la protéine Api5. Krejci P et al, en 2007 montrent une expression des protéines Api5 et hmwFGF2 plus importante (n=7) dans les leucémies lymphoïdes chroniques B par rapport au contrôle (n=5). En 2012, cette même équipe (Koci et al, 2012) montre qu'Api5 est exprimé dans de nombreux types de cancers incluant les cancers du côlon, du poumon, de l'estomac, du foie, du pancréas de l'œsophage et du rein. Ils détectent Api5 dans 29% des tissus examinés (n=50) et dans 16% contrôles. De plus, pour les cancers du rectum, ils trouvent une surexpression d'Api5 par rapport aux contrôles (tissu normal) appariés, Api5 leur apparaissant ainsi comme un marqueur pronostic potentiel de ces cancers. Par ailleurs ils notent le faible pourcentage

(29%) de cancers positifs pour Api5 sur l'ensemble des cancers étudiés. Ils en concluent que, le plus probablement, ce sont les cellules épithéliales qui le sur-expriment et donc que son expression est sous estimée dans cette analyse en western blot qui porte sur tous les tissus constitutifs des cancers examinés et pas seulement sur la fraction épithéliale. La même remarque peut également être étendue à la différence qu'ils observent entre les cancers et les tissus normaux car dans ces derniers la proportion de tissu conjonctif est également bien supérieure à celle observée dans la plupart des tissus carcinomateux.

L'expression dérégulée d'Api5 a également été détectée dans des études plus générales testant à grande échelle sur des puces, l'expression de plusieurs gènes parmi lequel *API5*.

Une étude avec des puces à ADN sur une lignée de leucémie myéloïde chronique, K562, a montré qu'en réponse à une chimiothérapie, l'expression d'Api5 est inhibée (Bianchini et al, 2007). La diminution de l'expression d'Api5 serait donc en relation avec une bonne réponse au traitement.

Une deuxième étude avec des puces à ADN effectuées à partir de 21 lignées cellulaires de mélanomes humain a permis de créer deux sous-groupes en fonction de l'expression d'un panel important de gènes : la surexpression d'Api5 se trouve associée avec un des sous-types de mélanomes identifiés (Su et al, 2009).

Jansen MP et al, 2005 ont analysé le profil génétique de cancers du sein positifs pour le récepteur aux œstrogènes ( $\geq 10\text{fmol/mg}$  de protéines) à la recherche de marqueurs moléculaires prédictifs de la réponse au Tamoxifène. Ils ont mis en évidence une signature génétique impliquant 44 gènes prédictifs d'une mauvaise ou d'une bonne réponse thérapeutique. Les auteurs de cette étude classent Api5 parmi les gènes surexprimés dans le groupe de patients présentant une progression tumorale sous traitement par le Tamoxifène donc prédictif d'une mauvaise réponse thérapeutique.

En ce qui concerne les anomalies du caryotype, des amplifications de la région génomique (11 p12-13) contenant *API5* ont été détectées dans des lignées de cancers du sein (Forozan et al, 1999) et dans des glioblastomes (Janka et al, 1996). Un travail plus récent (Rieber et al, 2009) a montré une amplification du gène *Api5* dans un médulloblastome chez un patient atteint d'un syndrome de Li-Fraumeni (mutation germinale du gène *TP53*).

***CONTEXTE ET OBJECTIF DE NOTRE ETUDE SUR LES RELATIONS ENTRE API5 ET ER $\alpha$  DANS LES CARCINOMES MAMMAIRES.***

Les informations concernant Api5 sont à l'heure actuelle encore très peu nombreuses. En 2006, lorsque nous avons entrepris de développer ces connaissances, seul son rôle de facteur de survie (Tewari et al, 1997) était établi ainsi que son partenariat avec les hmwFGF-2 mis en évidence par notre équipe (Van den Berghe et al, 2000). Dans une autre étude concernant le rôle des hmwFGF-2 et leurs implications dans la régulation de la signalisation d'E2 sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales, notre équipe avait également montré qu'E2 régulaient non seulement l'expression des hmwFGF-2 et de son partenaire Api5 dans les cellules endothéliales, mais aussi que l'expression d'Api5 était nécessaire à la migration E2 dépendante de ces mêmes cellules (Garmy-Susini et al, 2004). Quelques études suggéraient qu'Api5 jouait un rôle pro-tumoral dans le développement de certains cancers chez l'homme tel que le cancer du col (Kim et al, 2000), du poumon non à petites cellules (Sasaki et al, 2001), le cancer du sein (Forozan et al, 1999, Jansen MP et al, 2005) et les leucémies lymphoïdes chroniques B ( Krejci P et al, 2007). Cependant certaines de ces études étaient basées sur très peu de cas (Kim et al, 2000) et aucune n'avait étudiée l'expression de la protéine Api5 par immunohistochimie dans les cancers. Leurs résultats concernant l'expression d'Api5 dans les cancers ne permettaient donc pas de véritablement connaître l'expression d'Api5 dans le contingent carcinomateux puisqu'il s'agissait d'études sur des tissus contenant à la fois le contingent épithélial malin et le contingent conjonctif. C'est dans ce contexte impliquant Api-5 dans la signalisation d'ER $\alpha$  et en raison du rôle primordial que joue ER $\alpha$  dans le développement des cancers du sein que j'ai choisi d'étudier l'expression d'Api5 dans les carcinomes mammaires chez la femme par immunohistochimie. L'objectif de cette étude était de corrélérer l'expression d'Api5 avec l'expression d'ER $\alpha$  et de PR, au sein des

cellules carcinomateuses et avec les autres paramètres histologiques et cliniques (Her-2, age, type histologique, taille, grade, métastases ganglionnaires) déterminant le pronostic et le traitement de ces cancers. Cette étape ayant permis de montrer qu'il existait des corrélations entre Api5, ER $\alpha$  et certains facteurs pronostiques des carcinomes mammaires, mon 2<sup>ème</sup> objectif a été de savoir si Api5 était impliqué dans le développement des tumeurs mammaires dépendant d'E2. Pour cela, j'ai choisi de travailler sur une lignée de cancer du sein largement utilisée dans la littérature et exprimant ER $\alpha$  et Api5 de façon endogène : les MCF7 que nous avons modifiées afin d'obtenir des lignées MCF7 exprimant (lignée contrôle) et n'exprimant pas Api5 de façon stable (shMCF7). Puis nous avons analysé le développement des tumeurs greffées en sous cutané sur un modèle de souris nude. Une fois cette étape validée, mon 3<sup>ème</sup> objectif a été de connaître l'implication d'Api5 dans la transcription des gènes dépendant d'ER $\alpha$  dans les cellules shMCF7 et de savoir si cette implication était corrélée aux rôles connus d'Api5 et plus particulièrement dans l'apoptose et le cycle cellulaire. Pour cela nous avons choisi des gènes dont la transcription était régulée par ER $\alpha$  et qui avaient un rôle connu dans ces deux fonctions. Afin de déterminer les mécanismes moléculaires régissant les interactions entre Api5 et ER $\alpha$ , notre dernier objectif a été de savoir si les séquences enhancers régulant la transcription des gènes dépendant d'ER $\alpha$  modulaient l'implication d'Api5 dans la signalisation d'ER $\alpha$  et si inversement Api5 modulait l'interaction d'ER $\alpha$  sur son promoteur. Ces deux objectifs nous ayant permis de mettre en évidence un impact réciproque entre Api5 et les séquences régulatrices/promotrices des gènes cibles d'ER $\alpha$ , nous avons décidé de rechercher une interaction physique entre Api5 et ER $\alpha$  qui s'est avérée directe entre les deux protéines.



## **RESULTATS**

**I Api5 : Un nouveau co-facteur du récepteur aux oestrogènes ER $\alpha$  impliqué dans la progression tumorale des adénocarcinomes mammaires (Article en cours de soumission)**

**Api5: A new co-factor of estrogen receptor  $\alpha$  promoting tumor growth in breast adenocarcinoma**

**Céline Basset**, Marina Garcia-Jove Navarro, Emilie Berard, Ghislaine Escourrou, Tania Arcondeguy, Henrik Laurell, Monique Courtade-Saidi, Hervé Prats, **Eric Lacazette**.

### **ABSTRACT**

New prognostic markers and molecular targets are currently developing and represent new hopes concerning patient's management and target therapies in breast cancer. Estrogen receptor is known for a long time to be one of the major prognostic markers and is with estrogen the basic target for therapy. Co-regulators of estrogen receptor are often misexpressed. Rather than playing a causal role in the genesis of cancer they provide the potential for amplification of temporal disease progression. They are also able to counteract the biological activities of therapeutic drugs. In consequence, a greater understanding of these co-regulators master genes should prove to be beneficial to the diagnosis and therapy of cancer. Moreover, these co-regulators are upstream the signaling pathway of many transcriptional factors such as ER $\alpha$ . Consequently, inhibition of one oncogenic co-activator could simultaneously silence a cadre of downstream genes, which, together, are responsible

for the accelerated growth of the oncogenic cell and could prevent acquired therapeutic resistance. We present in this work a new co-regulator of estrogen receptor: Api5, which is known as an anti-apoptotic protein. We explored Api5 expression in breast cancer by a prospective immunohistochemical study and showed that the loss of Api5 was associated with bad prognosis factor and that it co-localized with ER $\alpha$  in breast carcinomas. We also showed that its presence was necessary for tumor growth. We observed that Api5 regulates ER $\alpha$  signaling on downstream target genes on ERE and AP1 sites. We also observed that Api5 facilitates ER $\alpha$  recruitment onto its target promoters. Finally we demonstrated that Api5 LXXLL domain is necessary for its interaction with ER $\alpha$  and we showed a direct interaction between Api5 and the ER $\alpha$  DNA binding domain (DBD). This is the first study that describes Api5 expression by immunohistochemistry in tumors and that demonstrates the functional and physical relationship connecting Api5 to ER $\alpha$  suggesting Api5 as a major cofactor of ER $\alpha$  signalization.

## INTRODUCTION

Invasive breast adenocarcinoma is the most common cancer in women (1). Among several factors, hormonal exposure (estrogens, progestogens and androgens) either endogenous or exogenous has been reported to increase the risk of breast adenocarcinomas (2, 3). As for other cancers, the main prognostic factors in breast adenocarcinomas are represented by the tumor grade (4) and stage. For staging, the status of axillary lymph nodes is the most important single prognostic factor (5). However, tumor histological type and molecular nuclear expression for estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), progesterone receptor (PR) and membranous expression of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2) are also major prognostic indicators (6). Moreover, these three biomarkers (ER, PR and HER2) are all targets and/or indicators of highly effective therapies against invasive breast carcinoma. In consequence they are used in the routine clinical management of patients (7, 8). Estrogens exert a wide variety of effects in the mammary gland normal development and in breast carcinogenesis, through binding to ER (9, 10, 11, 12). Two subtypes of ER are known, ER $\alpha$  (13) and ER $\beta$  (14). They show overall sequence homology, and are composed of six domains A to F (15). ER $\alpha$ , is expressed in 50 to 80% of breast adenocarcinoma and is known to have a dual role as it promotes tumor cell proliferation but is associated with well differentiated and less invasive tumors (16). ER $\beta$  is thought to antagonise ER $\alpha$  functions, but its role in breast cancer is still poorly understood (17, 18). ER $\alpha$  and ER $\beta$  (ERs) may act in the cell through genomic or non genomic pathways (19). For the genomic pathway, ERs act as a transcription factor which is activated either through its ligand binding (20) or through phosphorylation induced by growth factor (21). The ligand dependant or independant activation of ERs leads to their dimerisation and to their binding to cognate DNA responsive elements on target genes in a direct (22) or indirect manner (23, 24). The type of ligands, the phosphorylations as well as the mean used to bind DNA on the different recognition sequences trigger ERs

conformational changes which in turn determines co-regulator's binding (25, 26, 27, 28). Co-activators potentialise and co-repressor represses ERs transcription activating function AF-1 and AF-2. Some co-regulators may possess the two functions such as RIP140 (29) and SMRT (30). The induction of ERs transcriptional activation requires a sequential and dynamic association and dissociation of series of co-activators leading to: (i) chromatin remodeling (28; 31); (ii) stabilisation of the general transcription machinery through the binding of the multicomplex, mediator (32); (iii) protein renewal, and mRNA post transcriptional modifications (33; 34). The mechanisms regulating ERs transcriptional repressions are still not fully understood. Differentially to what is described for other nuclear receptor, the repression of ERs transcriptional activity needs in most cases its interaction with ligands such as E2, phytoestrogens or selective estrogen receptor modulator (SERM) (35; 36). Some corepressors, such as SMRT and NCoR, recrute histone deacetylase (HDAC) to remodel chromatin and others will compete with co-activator to bind ER (29, 37; 38; 39, 40). Others will drive co-factors to proteosomal degradation such as mSiah2 (35). Concerning the interaction links between co-activators and ER $\alpha$ , a majority of co-activators bind directly to ER $\alpha$  ligand binding domain (LBD) through a highly conserved sequence designated LXXLL or NRbox (41; 42; 43). Regarding the binding of co-repressors it was suggested that they could bind the LBD of ER, as co-activators do, through an analogous LXXLL box called the CoRNR box (LXXI/HIXXXI/L) (44; 45). However it emerges that these domains can't easily associate to the LBD of ER, as they do for other nuclear receptor, and that they would rather bind the DNA binding domain of ER (DBD) (46).

Anti-apoptotic factors are known to be highly implicated during tumor developement and present as interesting targets in regard to the sensitivity of tumor cells in response to drug. Api5, whom major function is to be an antiapoptotic factor involved in human carcinogenesis is one of these factors (47; 48; 49; 50). Indeed, its downregulation increases cell's sensitivity

to genotoxic treatments (50) and recently we showed that it contributes to E2F1 transcriptional activation of cell cycle (51). The few studies concerning Api5 expression in tumors (52; 53; 54; 55; 56; 57) relate that Api5 is associated with bad prognostic factors. Moreover, in a global study on biomarkers in breast cancer, Jansen et al 2005 (58) found that Api5 was among the overexpressed biological markers in a group of patients with breast cancer resistant to Tamoxifen. Furthermore, Api5 was also shown to be necessary for ER $\alpha$  signaling in endothelial cell and that its expression was regulated by ER $\alpha$  (59). Moreover Api5 possesses a LXXLL motif (60). The crystal study of Api5 shows its pluripotentiality to interact with many other proteins (61). However few of its partners are known. Api5 was shown to interact with FGF-2 (48), Acinus (50), and also interestingly to DEAD-BOX helicases of the SWI-Snf family such as AIP1/2 (62) and to ALCA1 (CHD1L) (63).

In regard to these studies that highlight a potential role of Api5 in promoting tumoral growth and to the relationship that emerges between Api5, ER $\alpha$  and breast cancer, our objective was to improve our knowledge on these emerging concepts. To address this purpose, we studied Api5 expression in a cohort of women breast adenocarcinomas. The loss of Api5 was associated with bad prognosis factors and Api5 was shown to co-localized with ER $\alpha$  in primitive and metastatic tumors. Furthermore we showed that Api5 presence was indispensable for tumor growth "in vivo". We observed "in vitro" that Api5 regulates some of ER $\alpha$  genes targets. We found a mutual regulation between Api5 and the promoter/enhancer DNA regions of target genes. Finally we demonstrated that Api5 LXXLL sequence was necessary for its interaction to ER $\alpha$  and that Api5 interacted directly with the DNA binding domain of ER $\alpha$  (DBD).

## RESULTS

### **Api5 is extensively and variably expressed in breast nuclear adenocarcinomatous cells and colocalises with ER $\alpha$**

Api5 expression on 81 primitive adenocarcinomas was evaluated by immunohistochemistry. The expression of Api5 was graded according to the percentage and intensity of Api5 nuclear expression in malignant epithelial cells (Figure 1.A. a1-a4). In regard to the expression of Api5, adenocarcinomas were classified into 4 groups: 31% were noted weak (group I), 27% moderate (group II), 32% strong (group III), 10% very strong (group IV) (Figure 1A. a1-a4; 1B1). Negative tumors were not observed (figure 1.B.1). The non-tumoral epithelial adjacent tissue was also analysed when present (n=61) (Figure 1.A. nt1-nt4). In non tumoral epithelial tissues, 95% of luminal cells displayed a very strong expression of Api5 while the remaining 5% of luminal cells showed a weak or moderate expression of Api5 (figure 1.B.2). As 95% of normal epithelial cells show a strong expression of Api5, we consider that a weak to moderate expression is to be interpreted as a deregulation of the expression of Api5 in a sense of a decrease. In consequence we conclude that Api5 is largely expressed in breast adenocarcinomas but with a variable intensity which is decreased in a majority of the tumors (58%). In this study, we also noticed that the expression of Api5 in myoepithelial cells, which do not express ER $\alpha$ , was weak to negative. To address more precisely the relevance of the relationship of Api5 with breast carcinogenesis, we analyzed by immunofluorescence the localization of Api5 in regard to ER $\alpha$  on a primitive breast adenocarcinoma (Figure 1.C. a1-a3) and on two pleural metastasis effusions of breast adenocarcinoma (One is shown, figure 1.C. m1-m3). We showed that Api5 and ER $\alpha$  were colocalized in the nuclear of adenocarcinomatous cells in all cases analyzed.

### **Api5 decreased expression in primary adenocarcinoma is correlated to more frequent lymph nodes metastasis and to a deregulation of ER $\alpha$ signaling**

We next compared the four groups of adenocarcinomas, as defined by their Api5 expression, to their pathological and molecular collected datas (table materials and methods) (table). First, we compared the two groups characterized by a weak to moderate (I and II) expression of Api5 to the two groups characterized by a high and very high (III and IV) expression of Api5. We found that women with lymph nodes metastasis at the moment of the first diagnosis presented more frequently adenocarcinoma with a weak to moderate expression of Api5 compared to those without lymph nodes metastasis (respectively 75% versus 44%  $p < 0,05$ ) (table). We conclude that a decrease of Api5 expression in primary tumor is an indicator of a disseminated disease.

Then we asked if the group characterized by the weakest expression of Api5 (group I) could be distinguished from the other three groups (II, III, IV). We found that adenocarcinomas with a disequilibrium of PR in regard to ER $\alpha$  ( $PR < ER\alpha$ ) had more frequently a weak level of Api5 (groupe I) compared to adenocarcinomas who expressed PR equally or greater than ER $\alpha$  ( $PR \geq ER\alpha$ ) (respectively 35% versus 0%;  $p < 0,05$ ) (table). Because Api5 loss is related to a downregulation of PR expression and since PR is known to be a gene target of ER $\alpha$ , we suggest that Api5 may play a role in regulating ER $\alpha$  transcriptional activity in breast adenocarcinoma.

### **Api5 is necessary for anchorage independent growth and in vivo tumorigenicity**

Then, in regard to the fact that Api5 is deregulated and alters ER $\alpha$  signaling in breast adenocarcinomas we asked if Api5 played a rôle in the development of these tumors. To answer this question we knocked down Api5 expression in MCF7 breast adenocarcinoma cell line with a stable transfection of a shRNA targeting Api5 (shApi5). For control we used the

same cell line stably transfected with a scramble shRNA (shSCR). We evaluated Api5 expression decreased in the shMCF7 cells by qRT-PCR, western blotting and immunohistochemistry (Figure 2.A, B, C). We noted that the shApi5 had no evident impact on MCF7 cell proliferation *in vitro* in cell culture dishes. Actually, shApi5 MCF7 cells were maintained in culture and passed at a similar rate compared to the control shSCR MCF7 cells. However the number of shMCF7 colonies able to form in soft agar was significantly decreased when Api5 was inhibited (shApi5) compared to the control (shSCR) (figure 2.D). Then to address if Api5 is necessary for tumor growth *in vivo*, we next injected subcutaneously into the anterior flanks of 10 distinct female mice the shApi5 MCF7 cells (n=5) and the shSCR MCF7 cells (n=5). We stimulated the tumoral growth with 17- $\beta$  oestradiol (E2) (see materials and methods). Among the 5 mice transplanted with the shSCR MCF7, one died without any evident cause and the others continued their development. Among the 5 mice transplanted with the shApi5 MCF7, two tumors stopped their growth and disappeared, one at the 2.5<sup>th</sup> week and the other at the 6<sup>th</sup> week of development and only three continued to grow. The analysis of the growth curves over the 7.5 weeks of growth (figure 2.E) showed a significantly decrease of the mean of the tumoral size for the 5 shApi5 MCF7 compared to the mean of the tumoral size of the 4 shSCR MCF7 (n=4) for each point measured ( $p < 10^{-3}$ ). After 7.5 weeks, all the mice were sacrificed and histological control of all visible tumoral mass (shApi5=3, shSCR=4) showed that the shMCF7 tumors looked like a carcinomatous cell proliferation (Figure 2.F). Immunohistochemical studies showed that these tumors were composed of a heterogeneous MCF7 cell population. The 3 shApi5 MCF7 tumors were composed of 70% of MCF7 cells expressing strongly Api5 and 30% not expressing Api5 whether the shSCR MCF7 tumors were composed of 95% of MCF7 cells expressing strongly Api5 and 5% not expressing Api5. (Figure 2.G)



### **Api5 regulates ER $\alpha$ signaling downstream target genes**

To understand those *in vivo* findings and in regard to the fact that ER $\alpha$  is a transcription factor we assumed that Api5 could be a co-regulator of ER $\alpha$  transcription. We first decided to explore the impact of Api5 depletion on ER $\alpha$  dependent transcription (figure 3). First, we checked by qRT-PCR that the shApi5 MCF7 cell line was effectively inhibited for Api5 in our three conditions of treatment, with ethanol (EtOH), 17  $\beta$ -Oestradiol (E2) and 17  $\beta$ -Oestradiol associated to ICI 182780 (E2 + ICI) (figure 3.A). Next we analyzed by qRT-PCR in the two sh MCF7 cell lines, shApi5 and shSCR, the expression of genes known to be implicated in pro or anti tumoral growth and depending on ER $\alpha$  for their transcription. As expected, in both MCF7 sh cell lines the E2 treatment stimulated the expression of the tested genes: *PR*, *ADORA1*, *P53*, *Cyclin D1*, *E2F1* and *Cyclin E* compared to the control condition with EtOH (figure 3.A). On the opposite, the treatment with E2+ICI inhibited all the tested genes expression compared to the E2 condition (figure 3.A). Api5 depletion did not show any impact on ER $\alpha$ , *E2F1* and *cyclin E* expression compared to the control (shSCR). However, Api5 depletion inhibited *PR* expression in the three conditions of treatments and inhibited *ADORA1* expression under E2 treatment. Moreover, inversely, Api5 depletion increased *p53* expression under E2 treatment and *Cyclin D1* under E2 and E2+ICI treatments (figure 3.A). These results showed that Api5 is implicated in the regulation of ER $\alpha$  mediated signal.

### **Api5 regulates ER $\alpha$ transcriptional activity on ERE and AP1 regulating sequences**

To deepen the regulating role of Api5 on ER $\alpha$  gene target, we wonder if this action could be dependant of the target gene regulating regions. To investigate this, we used three MCF7 cell lines stably transfected with three different clones, the two clones previously used, shApi5 and shSCR, and another one directed against Api5 named shApi5'. We transfected each shMCF7 cell lines with three estrogen-responsive plasmid reporter, the ERE-tk-Luc and the C3-luc, responding to E2-stimulated ER $\alpha$  through ERE sites and the AP1-tk-luc responding to E2-stimulated ER $\alpha$  through an AP1 site. In the shApi5 and shApi5' MCF7, The ERE-TK-Luc, C3-luc and Ap1-TK-luc activities were decreased respectively to 85 %, 73% and 59% and to 85%, 65% and 52% in response to E2 in comparision to the control promoter SV-40-luc (figure 3.B). These results are consistent with the fact that Api5 is necessary for ER $\alpha$  transcriptional activity on ERE and AP1 regulating sequences.

### **Api5 Modulates ER $\alpha$ and Polymerase II (Pol II) binding to PS2 and PR ER $\alpha$ responsive promoters**

Given that Api5 regulates gene target expression on their ERE and AP1 regulating sequences and to go further in the functional relationship between Api5 and ER $\alpha$  we investigated the possibility that Api5 could potentialize ER $\alpha$  recruitment on its target promoters. We carried out ChIP experiments against ER $\alpha$  on PS2 and PR promoters with the same cell lines shApi5 and shSCR MCF7 (Figure 4). Under E2 treatment, relative to control (shSCR MCF7), Api5 knockdown induced a decreased recruitment of the ER and Pol II on PS2 (2,5 fold) and PR(3.5 fold) ER $\alpha$  responsive promoters. These results clearly demonstrate that Api5 contributes positively to the recruitment of ER $\alpha$  on its target promoters.

### **Api5 directly interacts with ER $\alpha$**

To explore if Api5 regulates ER $\alpha$  transcriptional activity directly or indirectly we next investigated whether Api5 could interact with ER $\alpha$ . Api5 owns a LXXLL motif known to be a key determinant for the binding to ER $\alpha$  (figure 5.A). We first tested the interaction of endogenous Api5 and ER $\alpha$ . We immunoprecipitated Api5 from MCF7 lysate and immunoblotted for ER $\alpha$ . We observed that endogenous Api5 coimmunoprecipitated endogenous ER $\alpha$  (figure 5.B). We next transfected the MCF7 line with Api5 tagged HA (HA-Api5 LXXLL) and with Api5 mutated for LXXLL tagged HA (HA-Api5 LXXAA) plasmid. We immunoprecipitated HA-Api5 LXXLL and LXXAA and immunoblotted for ER $\alpha$ . We observed that HA-Api5 co-immunoprecipitate ER $\alpha$  and that the LXXLL motif was necessary for this interaction (figure 5.C). To further study the mechanism of interaction we processed to a GST-pull down assay. We produced the ER $\alpha$ -GST cloned domains (A/B, C, D, E and F) and Api5 recombinant protein and immunoblotted Api5. The ER $\alpha$  E/F domain containing the AF-2 motif that usually binds the LXXLL motif co-precipitated Api5. However, the ER $\alpha$  domain C co-precipitated Api5 (figure 5.D).

### **Api5 is associated with nucleosomal and heat shock proteins**

To investigate the Api5 interactants we had previously, in an independent study, used an aortic bovine adult endothelial (ABAE) cell line and we had tested protein interaction with a technology based on surface plasmon resonance (SPR) on a BIAcore optical biosensor instrument. For this Api5 was immobilized on the chip for recovery strategy. The mass spectrometry analysis of the recovery proteins highlighted the interaction of Api5 with Histone H4 and Histone H2B nucleosomal proteins and with heat shock protein HSP 90 (SD).

## DISCUSSION

### **The regulation of the expression of ER $\alpha$ downstream target genes involved in apoptosis by Api5 is another pathway explaining its antiapoptotic function**

Api5 first and major known function is to be an antiapoptotic factor (47). Concerning the mechanisms explaining Api5 antiapoptotic role, Morris et al showed that Api5 inhibited the E2F1 induced apoptosis downstream of E2F1 transcriptional activity (49). Then Rigou et al demonstrated that the interaction of Api5 with Acinus protects Acinus from caspases cleavage inhibiting Acinus mediated DNA fragmentation (50). In regard to our results, we propose another pathway where Api5 inhibits apoptosis through regulating the transcriptional activity of ER $\alpha$  on targets genes with apoptotic functions. Indeed, Api5 promotes *PR* and *ADORA1* expression which are known to be anti-apoptotic (64, 65, 66, 67, 68) and inhibits *p53* expression which is one of the major pro-apoptotic known fsactor in response to genotoxic stress (69).

### **Api5 regulates the expression of target genes involved in cell cycle**

In a recent study we showed in a Hela culture cell model (51) that Api5 contributes to E2F1 transcriptional activation of cell cycle associated genes by facilitating E2F1 recruitment onto its target promoters. In the present study with an MCF7 cell line model, as in our previous study on Hela cell line, the loss of Api5 expression does not impact on *E2F1* expression but inhibits its target expression *cyclin A* (Data not showed). We also showed in the MCF7 cell line that Api5 inhibited, E2 liganted ER $\alpha$  (E2-ER $\alpha$ ) downstream target gene, *p53* which is known to arrest cell cycle (69). These results show that Api5 might contribute to the regulation of cell cycle through ER $\alpha$  signalization in MCF7 cell lines as it does for E2F1 signaling. However, differentially from our results on Hela cell line, Api5 down-regulated E2-ER $\alpha$  transcriptional activation of *cycline D1* and had no impact on *cycline E* in the MCF7 cell

line. These differences in the regulation of some genes between HeLa and MCF7 cell lines underline the cell type specific action of Api5 and show the necessity for complementary studies to characterize the function of Api5 in regard to cell cycle and proliferation in the MCF7 cell line and breast tumors.

### **Api5 is necessary for tumor growth in vivo**

We found that Api5 was necessary for tumor growth in our mice model. Unexpectedly the examination of the tumors that grew from the Api5 knockdown MCF7 cells showed a majority of cell expressing strongly Api5 while the initial population showed only scarce cell expressing Api5. Given that in vitro, the cell population stably inhibited for Api5 did not presented any evident difficulty to survive and proliferate, we suggest that this observation is a consequence of phenomenon that occurs only in vivo. In consequence we propose that in vivo, the Api5 knockout cell can hardly survive. Therefore, the tumors that grew from the Api5 knockdown population developed from cells that escaped the Api5 knockdown infection. In regard to the fact that we did not observe any Api5 negative adenocarcinoma we conclude that in vivo tumors can't survive nor grow if they don't express Api5 at least weakly which is in accordance with the anti-apoptotic and pro-proliferative known functions of Api5.

### **Api5 loss is associated to axillary lymph nodes metastasis**

The depletion of PR (70) as well as ER $\alpha$  dysfunction or loss (71) have been implicated in the apparition of metastasis possibly by promoting epithelial to mesenchymal transition (EMT) in Human Breast Cancer Cells. In this process, epithelial cells loose polarity and interactions and acquire migratory properties of mesenchymal cells. One of the defining features of EMT is the loss of the cell adhesion molecule E-cadherin which with other junction proteins is thought to be an initiating step for transition of breast tumors from a

benign to an invasive state leading to vascular metastasis (71). As in our study Api5 decreased expression is related to the presence of more frequent metastasis and to a dysregulation of ER $\alpha$  signaling. And as this dysregulation of ER $\alpha$  leads to a decrease of PR in vitro and in vivo, we suggest that Api5 might as PR disappear transiently during EMT. In this regard we observed that Api5 knockdown cell grew in vitro with a more diffuse and less cohesive pattern than the control (data not shown) and we also observed in our cohort one tumor that showed focally and at the same place discohesion of cells, a decrease in Api5, PR and E-cadherine (data not shown).

### **Molecular mechanisms**

To answer to the mechanistic questions that raise our study we propose several pathways that can explain how Api5 regulates ER $\alpha$  signaling and resulting functions (figure 6). First of all we propose that Api5, as most known co-activators, interacts through its LXXLL motif with the AF-2 region of the LBD (41, 60). But in regard to the fact that we found a direct interaction of Api5 with the DBD of ER $\alpha$  we cannot completely exclude that Api5 binds to the C domain of ER $\alpha$  through its LXXLL or through another region. In these two configurations we suggest that Api5 is able to recruit co-regulators to stabilize ER $\alpha$  on his promoter and induce pol II recruitment, stabilization and activation. Moreover in our study Api5 knockout downregulated ER $\alpha$  signaling on ERE and AP1 reporter plasmid regulating sequences and endogenously, downregulated ER $\alpha$  target gene *ADORA1* and *PR* which contain respectively in their regulatory regions ERE (72) and ERE plus AP1 sites (73, 74) but not the other ER $\alpha$  targets regulated by other enhancers. Regarding to these results we suggest that the co-activator role of Api5 is specific to ERE and AP1 sites. Moreover regarding AP1 and APi5 we can also propose that they interact together through their leucine zipper domains to stabilize the complex on this site.

Regarding Api5 repressive activity for some ER $\alpha$  target genes, we propose two pathways. The first suggest that Api5 tethers co-activators and ER $\alpha$  in priority on ERE and AP1 enhancers. And in consequence when Api5 is depleted, co-activators and ER $\alpha$  are released and become free to work on other enhancers that do not require Api5. But we shall also considere, by analogy to what is known for other co-repressors such as SMRT, that Api5 can possede both co-activator and co-repressor functions (36, 46). In this regard, we propose a second pathway based on Varlanova study, where Api5 will interact through its LXXLL domain with the DBD of ER $\alpha$ . In this configuration, as for SMRT, Api5 will be able to recruts other co-repressors to inhibit ER $\alpha$  transcriptional activities. Moreover, Api5 knockdown upregulated *p53* expression which is known to possess SP1 responding sequences (75) and half ERE (76) but no palindromic ERE or AP1 sites and also upregulated *cyclin D1* expression which possesses various regulatory sites but no ERE (77, 78). Although *cyclin D1* possesses an AP1 site, it was related to function weakly (78). Regarding to these results we suggest that the co-repressor role of Api5 is specific to other enhancers than ERE and AP1 sites such as SP1 sites.

In conclusion, this is the first study that describes Api5 protein expression in situ in breast adenocarcinoma and that demonstrates that, as ER $\alpha$ , it is necessary for tumor growth but also that its presence is an indicator of good prognostic. We also suggest that Api5 acts as a major mediator of ER $\alpha$  signaling allowing the recrutement and the stabilisation of the transcriptional complex on the promoter of ER $\alpha$  target genes and that this promoting action is modulated by specific target gene enhancers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Patients, Tumors, Immunohistochemistry**

A prospective study of the histopathology of breast adenocarcinoma of 81 female patients was driven from November 2011 to January 2013. The samples were obtained from the Departement of Pathology at the Rangueil University Hospital (Toulouse, France). Histopathological and related molecular biomarkers used in daily routine for prognostic and therapeutic purpose were listed and are presented in table material and methods. Tumoral tissues of about 1.5x1x0.5 cm were taken off from the surgical sample and fixed with 4% formalin less than two hours after surgical removal. After 24 hours of fixation they were paraffin-embedded. The tumoral fragment could then be stained with Hemalun-Eosin and processed by immunochemistry. Briefly, 4µm-thin paraffin sections were cut, mounted on silane coated slides, and incubated overnight at 37 °C. The sections were dewaxed in xylene, rehydrated with decreasing concentrations of ethanol and antigen retrieval was performed using citrate buffer (pH 9.0) in a 95°C water-bath for 40 minutes. Immunohistochemistry was performed in a DAKO autostainer link 48. Primary antibodies used were diluted in DAKO's diluant the Anti-Ap15, 1/600, (polyclonal ab56392, Abcam), anti-RE $\alpha$  1/50 (1D5 Dako), RP 1/50 (NCL-L- PGR-Leica), E-cadherin 1/150 (NCH-38 Dako), c-erbB-2 1/ 100 (Dako). Secondary antibody was anti-mouse, anti-rabbit (DAKO) with a flex amplification signal and a revelation with Diaminobenzidine (DAB). The different antibodies were performed on serial consecutive sections. Microscopic analyses and interpretation of staining were carried out by histopathologists in the field (G.Escourrou). Grading was evaluated as described by Eltson and Ellis (79) .The TNM tumor staging system was used (80). AJCC cancer staging manual.7th edition.Springer; New York). Histological type as well as ER $\alpha$ , PR and HER2 expressions were evaluated as recommended (6).



## **Immunofluorescence Microscopy**

Patient's cells from peritoneal and pleural effusions were washed twice in PBS and cytocentrifuged on a slide. Slides were then fixed in acetone for 10 minutes at 4°C and washed with distilled water. The paraffin's sections were treated as described previously. Cells were permeabilized in a 95°C water bath for 40 minutes and for tissue antigen retrieval was done in microwave. For both cells and tissues these treatments were performed in a citrate pH6 buffer. Antibodies were diluted in phosphate buffer containing 1% Bovine Serum Albumin and 200 µl were incubated on the slides in a humidified chamber. Primary antibody the polyclonal rabbit anti-API5 1/1000 (ab56392, Abcam) was incubated over night at 4°C. On the next day were added sequentially the secondary antibody Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG 1/500 (Molecular Probes), the monoclonal anti-RE $\alpha$  1/100 (1D5 Dako) and the Alexa fluor 633 rabbit anti mouse IgG 1/500 (Molecular Probes). These antibodies were each incubated for 30 min at room temperature after washing of the previous antibody. Nuclei were counterstained with propidium iodide (PI). Images were obtained using LSM510 Confocal Laser Scanning microscope equipped with an Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss) and a 40X objective lens (CApochromat,1,2 W, Oil), using three laser lines (488, 543 and 633 nm).

## **Cell Lines, culture conditions, transfections**

MCF7 (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) cell lines were grown and maintained in DMEM /Ham F12 media (DUBELCCO) DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% glutamine (Gibco) and antibiotics (gentamycine), at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. For defined estrogen culture experiments, cells 70% confluences were trypsinized and plated for 12 hours. Then they were washed twice and a steroid depleted media (phenol red-free DMEM/ham F12 supplemented with 2.5% charcoal stripped calf

bovine serum- PAA) was added. Cells were cultured for at least 72 hours before treatment with 17 $\beta$ -Estradiol (E2) (Tocris bioscience) 10nM, ICI 182,780 100nM (Tocris bioscience) or vehicle control (ethanol (EtOH) 0.1%).

Cells were transfected using JetPEI for DNA constructs, 2HA2FlagApi5, transfection reagents (Polyplus transfection) according to the manufacturer's instructions. MCF7 cell lines with stable silencing of Api5 were generated with lentiviral infect particles produced in HEK293FT (Invitrogen#R70007) with the two helper plasmids pLvVSVg and pLvPack (Sigma Aldrich) plus a lentiviral plasmid. ShRNA against Api5 originates from a lentiviral plasmid MISSIONH pLKO.1-puro (clone: NM\_006595.2-278s1c1) containing the sequence CCGGGCAGCTCAATTTATTCCGAAACTCGAGTTTCGGAATAAATTGAGCTGCTTTT TG and shSCR originates from a lentiviral plasmid MISSIONH pLKO.1-puro Non-Target shRNA Control Plasmid DNA (ref:SHC016-1EA) containing the sequence CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTT TTG, both from the Sigma Aldrich Company. Two clones of shRNA obtained against Api5 were used in our experiments, the shApi5 and the shApi5' and in control the shSCR.

### **Western Blot analysis**

Cells were collected, resuspended in Triton X100 sample buffer and sonicated. 30mg of proteins were resolved in 4–20% denaturing polyacrylamide gels (Thermo Scientific) and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham). Immunoblotting were performed using polyclonal anti-API5 antibody (ab56392 Abcam), and ER $\alpha$  HC-20 antibody: sc-543 (Santa Cruz), and monoclonal anti-HA antibody H9658 (Sigma) and anti-RPS19 (3C6 Abnova). The signal was detected using enhanced chemiluminescence detection reagent (Amersham).

### **Soft-agar growth assay**

$1 \times 10^5$  MCF7 shSCR and MCF7 shApi5 were grown in triplicate in complete DMEM/Ham F12 (Dubecco) 10% BFS containing 0.3% soft agar in 15-cm plates over a layer of solidified DMEM/Ham F12 10% BFS containing 0.7% soft agar. Medium was added twice a week to maintain humidity. After 2, 3, 4, 5 weeks colonies were stained with MTT ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) for 3 h at  $37^\circ\text{C}$  and 10 to 15 pictures were taken at 40 magnification and colonies were counted.

### **In vivo tumorigenicity assay**

ShSCR et shApi5 MCF7 cells ( $5 \times 10^6$ ) were included in 1ml matrigel and injected subcutaneously into the anterior flanks of female BALB/c nude mice (Charles River) 10 weeks old. Tumoral growth was promoted with 17- $\beta$ - oestradiol microspheres as described previously (81). Mice weight and tumors were measured with a caliper twice a week for seven weeks. When the most important tumors reached around  $1 \text{ cm}^3$  after 7,5 weeks ,all mice were killed, and the tumors were measured and processed for histology and immunochemistry as described previously for human tumor. All animal procedures met the guidelines of European Community Directive and were approved by the PRBB ethical committee

### **RNA Extraction and Quantification Using Real-time PCR**

Total RNA was extracted using the TriZol reagent protocol (Invitrogen). RNA was extracted from three set of independent shMCF7 cell culture prepared as described previously for defined estrogen culture. Reverse transcription was performed with  $1 \mu\text{g}$  of total RNA using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) and oligo(dT) primers. For quantification of mRNAs, real-time PCR was performed using SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad). Assays were performed on 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied

Biosystems). All the real-time PCR analyses were done in duplicate. The oligonucleotides sequences (5' - 3') used were: GUSB (housekeeping gene) sense (S) GATGACATCACCGTCACCACCAGC, GUSB antisens (AS) CCCAGTCCCATTTCGCCACGACT; Api5(S) CCGACAGTAGAGGAGCTTTACCGCA, Api5(AS) AGGCATCTTTATGCTGGCCCACT; ER $\alpha$ (S) ACTGGGCGAAGAGGGTGCCA, ER $\alpha$ (AS) TGGAGCGCCAGACGAGACCA; PR(S) AACTGCCCAGCATGTGCCT, PR(AS) GGAACGCCCACTGGCTGTGG; ADORA1(S) TGGCCCTGCTGGCAATTGCT, ADORA1(AS) AGGGGTCAGTCCCACCACGA; P53(S) CCAGGGAGCACTAAGCGAGCGA, P53(AS) GAACATCTCGAAGCGCTCACGC; cycline D1(S) CGCAAACACGCGCAGACCTT, cycline D1(AS) GCCACCATGGAGGGCGGATTG; E2F1(S) CGACCTGAACTGGGCTGCCG, E2F1(AS) CGCCCACTGTGGTGTGGCTG; Cycline E(S) AAGCACTTCAGGGGCGTCGC, Cycline E(AS) GGTGAGGAGCCCACTGGGGA.

### **Luciferase Reporter Assay**

ShMCF7 cells were prepared as described previously for defined estrogen culture for 72 hours. Then they were co-transfected with the indicated promoter constructs pGL2- ERE-tk-Luc (300ng) (The estrogen-responsive reporter ERE-TK-Luc is composed of the vitellogenin A2 estrogen-responsive enhancer (ERE) controlling a minimal thymidine kinase promoter (TK81) and luciferase, in plasmid pGL2), pGL2-complement 3 (C3)-luc (300ng) (the estrogen-responsive reporter pGL2-C3-Luc is composed of the ERE of C3 controlling a luciferase, in plasmid pGL2), pGL2-AP1 (AP1-tk-luc) (The estrogen-responsive reporter AP1-TK-Luc is composed of an AP1 site controlling a minimal thymidine kinase promoter and luciferase, in plasmid pGL2) (300 ng), or pGL2-SV40 (50 ng) using JetPEI reagent according to the manufacturer protocol (Polyplus transfection). 4 hours after transfection they

were treated for twenty-four hours with E2 10nM, or EtOH 0.1%. Then the cells were lysed in Passive Lysis Buffer (PLB) and firefly luciferase activity was measured in a LB960 luminometer (Berthold) according to manufacturer's recommendations and by using the dual reporter assay kit (E1960) (Promega)

### **Immunoprecipitations**

For nuclear extract,  $5 \cdot 10^7$  control MCF7 cells or cells transfected with HA-FIF (with Hemagglutinin tag) expression vector were washed in PBS and resuspended in 4 ml of fractionation buffer (0,15M NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 mM Tris, pH 7,5; 0,1% Tween 20; protease inhibitors). Cells were ruptured by using freezing/thawing. Nuclei were collected by centrifugation resuspended in Lysis Buffer (150 mM NaCl, 1% 100X Triton, 50 mM Tris HCl pH=8) and sonicated. Co-Immunoprecipitation were performed using the mMACS HA Tagged Protein Isolation Kit (Miltenyi Biotec) or the BioAdembeads protein G 0433 kit for endogenous Co-Immunoprecipitation. Western Blot were done as described with API5 antibody (ab56392 Abcam), and ER $\alpha$  HC-20 antibody: sc-543 (Santa Cruz), and monoclonal anti-HA antibody H9658 (Sigma) and anti-RPS19 (3C6 Abnova).

### **GST pull down**

ER $\alpha$  mutants RE 2-184 A/B; RE 179-312 C/D; RE 251-312 D; RE 251-595 D/E/F; RE 313-599 E/F ( a generous gift of Gilles Flouriot ) were linked to Glutathione S-transferase (GST) and were expressed as well as GST alone in *Escherichia coli* BL21 and bound to glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia). The recombinant Api5 protein was also produced and was incubated with the beads and treated as recommended by the manufacturer. The interactions of the ER $\alpha$  mutants with API5 were analysed by western blot as described previously with an API5 antibody (ab56392 Abcam).

### **Preparation of Chromatin Fractions**

$3 \times 10^7$  MCF7 cells were washed in PBS and resuspended in 1 ml of chromatin fractionation buffer (0,15 M NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 mM Tris, pH 7,5; 0,1% Tween 20; protease inhibitors). Cells were ruptured by using Ultra-Turrax Ultra-Turrax (IKA) in the presence of 0.1% of NP-10. After centrifugation (1500 rpm, 10 min at 4°C), nuclei were digested with DNase 1 (0.2 mg/ml) for 10 min at 30°C and pelleted by a brief centrifugation. Chromatin fractions were prepared by adding NaCl, to a final concentration of 0.4 M, to the nuclear pellets resuspended in chromatin fractionation buffer. After 30 min at 4°C, the nuclei were centrifuged at 13000 rpm for 10 min, and the supernatant (chromatin fraction 0,4 M) was saved. Chromatin fractions 0.8/1/2 M were similarly prepared by adding NaCl to the desired final concentration. The final pellet was saved as residual pellet. Mouse monoclonal [1TBP18] to TBP (ab818, Abcam) and rabbit polyclonal to Histone H3 (ab1791, Abcam) antibodies were used to validate the chromatin fractions by Western Blot analysis.

### **Chromatin Immunoprecipitation Assay**

Chromatin Immunoprecipitation assay was performed using Transcription Factor ChIP Kit (diagenode), following manufacturer's protocol. The immunoprecipitation of DNA-protein complexes was achieved with antibodies directed against ER $\alpha$  HC-20 antibody (sc-543, Santa Cruz) and Pol II. We measured the abundance of the candidate sequences by quantitative PCR amplification, as previously described. We performed immunoprecipitations with normal rabbit serum, PCR amplified regions of the albumin promoter and the 1, 5 kb region upstream the interested region as negative controls (data not shown). Values reflecting chromatin enrichment are reported as the percent of input.

## **Biacore**

All binding and kinetics studies based on SPR technology were performed on a four-channel Biacore 3000 optical biosensor instrument (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Immobilization of API5 protein was by amine coupling performed on a CM5 sensorchip (Biacore SA sensorchip) in acetate buffer (pH=5) (Biacore AB, Uppsala, Sweden). All immobilization steps were performed at a final protein concentration of 100ug/ml at a flow rate of 10 µl/min. Final level of immobilisation was about 8000 RU. A channel was left empty and was used as a reference surface for non-specific binding measurements. Binding analyses were performed with nuclear extracts (400 ug/ml) or cytosolic extracts (400 µg/ml) from ABAE (Adult bovine endothelial Cells) (cells over the immobilized FIF at 25°C for 4 minutes at a flow rate of 20 µl/min. For recovery strategy, API5 protein was immobilized on 3 channels of a CM5 sensorchip at a level of 8000 RU per channel with an empty channel as reference surface. Nuclear extracts or cytosolic extracts from ABAE cells injected at a final concentration of 400 µg/ml for 6 min at a 20µl/min flow rate. Four cycles of recovery with a 50mM-TEA/0,5M-Urea solution were performed to obtain 10 000 RU of recovered proteins corresponding to 10ng of proteins. Recovered proteins were subjected to MS analysis for identification.

## **Statistical analysis**

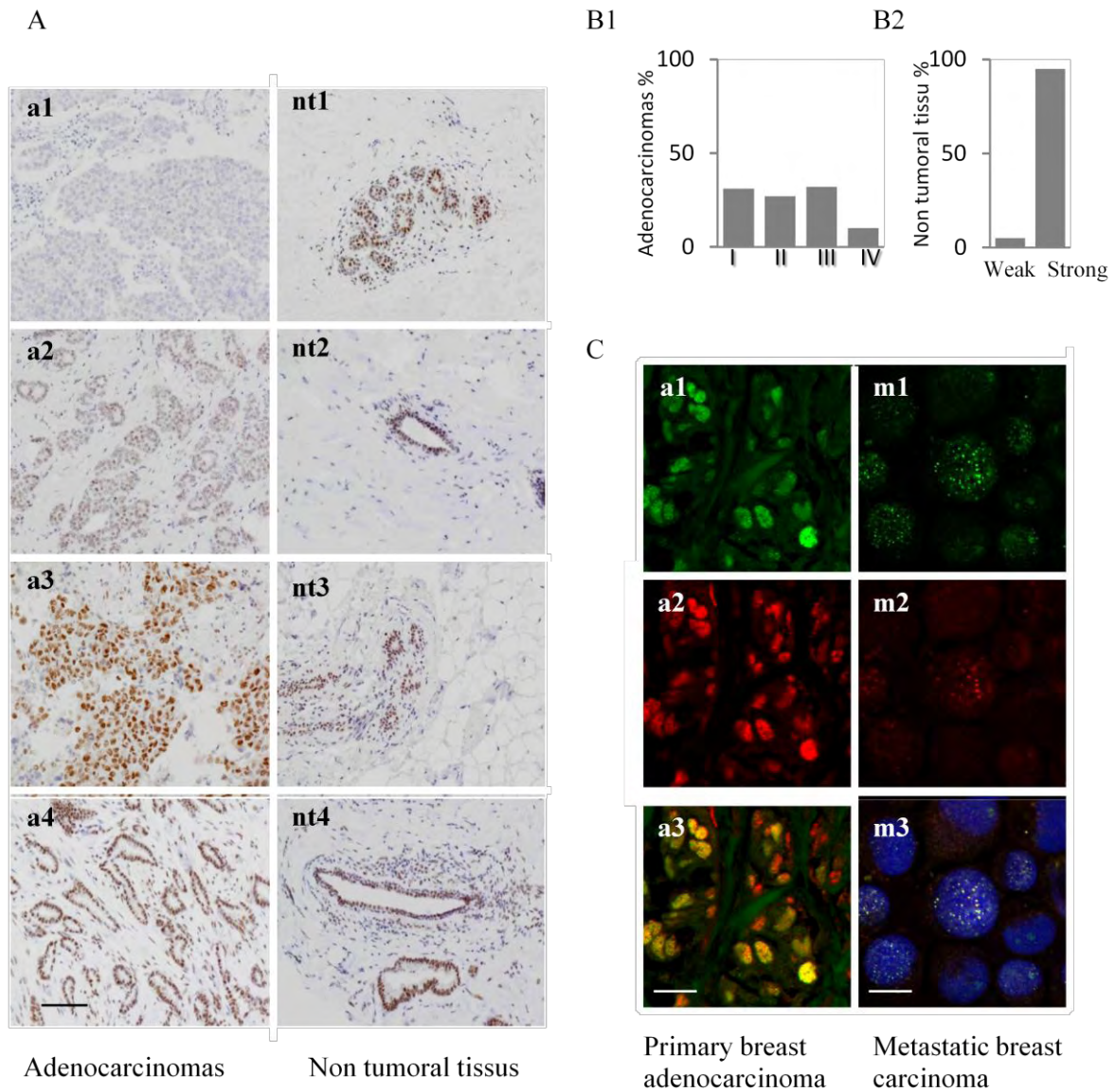
Statistical analysis was performed on STATA statistical software, release 11.2 (STATA Corporation, College station, TX, USA) by an expert in biostatistics for clinical studies (Dr Emilie Bérard). We described qualitative data using number (N) and frequency (%) and minimum (Min), maximum (Max), mean and Standard Deviation (SD), median and Inter-Quartile Range (IQR) for quantitative data. Qualitative variables were compared between groups (for example, API=0-1 versus API=2-3 and API=0 versus API=1-2-3) using

the  $\chi^2$ -test (or Fisher's exact test in case of small expected numbers). Student's *t*-test was used to compare the distribution of quantitative data (or Mann-Whitney's test when distribution departed from normality or when homoscedasticity was rejected). All reported p-values were two-sided and the significance threshold was  $< 0.05$  (we talk to tendency for  $p < 0.20$ ).



# TABLES, FIGURES, LEGENDS

## FIGURE 1



**Figure 1. Api5 expression in breast adenocarcinoma and non tumoral tissues**

**A.** Summary of Api5 expression classification in human breast adenocarcinoma left and non tumoral adjacent tissues right. Left: a1, weak expression classified as Group I, Api5 nuclear immunostaining 0 to 1+  $\geq 90\%$  with 2 or 3+  $< 10\%$ ; a2, moderate expression classified as group II, Api5 nuclear immunostaining 0 to 1+  $< 90\%$  and 2 or 3+  $> 10\%$  but 3+  $< 30\%$ ; a3, strong expression classified as group III, Api5 nuclear immunostaining 3+  $\geq 30\%$ ; a4, very strong expression classified as group IV, Api5 nuclear immunostaining 4+ 100%. Right, non tumoral respective adjacent tissues (nt1-4) showing 3 (nt1, 3) to 4+ (nt 2, nt4).

**B.1** distribution of the adenocarcinomas (n=81) in the different group of expression of Api5 I (31%), II (27%), III (32%) or IV (10%). **B-2** Percentage of non tumoral tissue (n=61) with a weak expression (5%) or a strong expression (95%).

**C.** Api5 colocalise ER $\alpha$  in breast adenocarcinoma : a1-3, breast primary adenocarcinomas; m1-3 metastatic breast carcinomas ; a1, m1 immunofluorescent green staining of Api5; a2, m2 immunofluorescent red staining of ER $\alpha$ ; a3, m3 merge of Api5 and ER $\alpha$  immunofluorescent staining in yellow. The blue staining in m3 is representing the nuclear staining with PI.

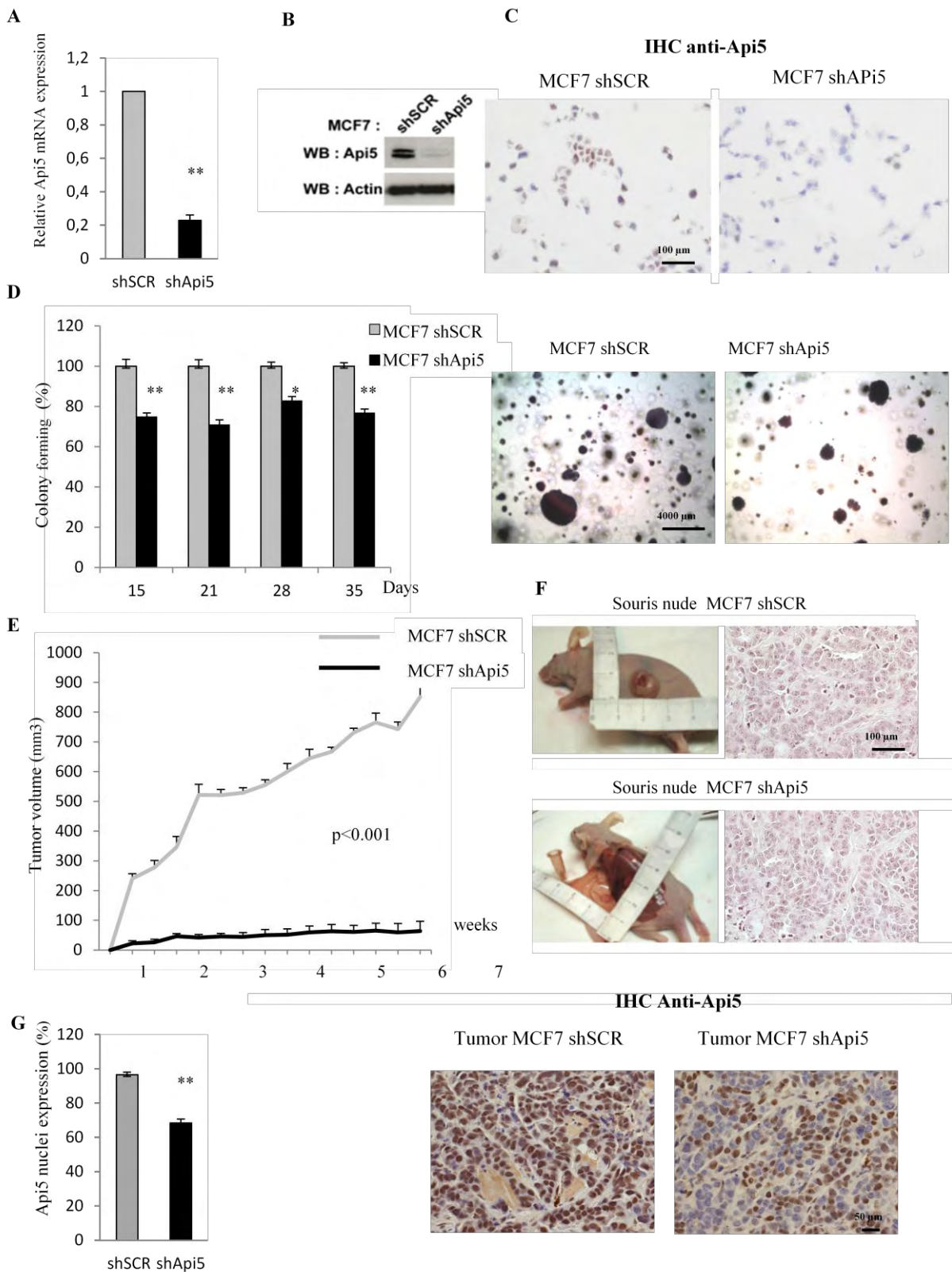
**Table. Clinical, histopathological and molecular parameters correlated to Api5 intensity of expression in breast adenocarcinoma (univariate analysis)**

		<b>47(58)</b>	<b>34(42)</b>		<b>25(30.9)</b>	<b>56(69.1)</b>	
Age (years)	Mean(SD)	64.5(13.7)	59.1(12.3)	<b>0.0703</b>	65.1(12.4)	61(13.6)	<b>0.1977</b>
	Median(IQR)	65(56-76)	63(45-67)		66(59-76)	63(47.5-70.5)	
	Min, Max	31,90	33,79		38,85	31,90	
<b>Size (cm)</b>	Mean(SD)	2.4(1.9)	2.2(1.9)	<b>0.3348</b>	2.1(1.1)	2.4(2.2)	<b>0.8496</b>
	Median(IQR)	2(1.2-2.8)	1.8(1.1-2.5)		2(1.3-2.5)	1.9(1.1-2.5)	
	Min, Max	0.5,11	0.5,11		0.9,5.5	0.5,11	
<b>Lymph nodes, n(%)</b>	negative	20(44.4)	25(55.6)	<b>0.0055</b>	12(26.7)	33(73.3)	<b>0.3605</b>
	positive	27(75)	9(25)		13(36.1)	23(63.9)	
<b>Histo- pathology, n(%)</b>	Ductal NOS	39(59.1)	27(40.9)	<b>0.6363</b>	21(31.8)	45(68.2)	<b>1</b>
	lobular	8(57.1)	6(42.9)		4 (28.6)	10(71.4)	
	medullary	0(0)	1(100)		0 (0)	1(100)	
<b>grade, n(%)</b>	I	6 (46.2)	7(53.8)	<b>0.6205</b>	1 (7.7)	12(92.3)	<b>0.0564</b>
	II	27(61.4)	17(38.6)		13(29.5)	31(70.5)	
	III	14(58.3)	10(41.7)		11(45.8)	13(54.2)	
<b>HER2, n(%)</b>	negative	40(58)	29(42)	<b>0.9812</b>	21(30.4)	48(69.6)	<b>1</b>
	positive	7 (58.3)	5(41.7)		4 (33.3)	8(66.7)	
<b>ER (%)</b>	Mean(SD)	68.1(40.7)	63.6(35.7)	<b>0.6116</b>	65.2(43.1)	66.7(36.7)	<b>0.8743</b>
	Median(IQR)	90(15-100)	75(40-100)		90(0-100)	80(44.5-100)	
	Min, Max	0.100	0.100		0.100	0.100	
<b>ER(%) n(%)</b>	ER=0%	10(71.4)	4(28.6)	<b>0.2637</b>	7(50)	7(50)	<b>0.1145</b>
	ER>0%	37(55.2)	30(44.8)		18(26.9)	49(73.1)	
<b>PR(%)</b>	Mean(SD)	32.2(35.7)	35.8(40)	<b>0.6692</b>	21.5(30.3)	39.1(39.1)	<b>0.0621</b>
	Median(IQR)	15(0-70)	15(0-80)		2(0-40)	22.5(0-80)	
	Min, Max	0.100	0.100		0.90	0.100	
<b>PR(%) n(%)</b>	PR=0%	16(55.2)	13(44.8)	<b>0.6977</b>	11(37.9)	18(62.1)	<b>0.3037</b>
	PR>0%	31(59.6)	21(40.4)		14(26.9)	38(73.1)	
<b>ER=0 &amp; PR=0, n(%)</b>	yes	10(71.4)	4(28.6)	<b>0.2637</b>	7(50)	7(50)	<b>0.1145</b>
	no	37(55.2)	30(44.8)		18(26.9)	49(73.1)	
<b>ER &amp; PR (%) n(%)</b>	rp>=re(>0)	6 (37.5)	10(62.5)	<b>0.1380</b>	0 (0)	16(100)	<b>0.0026*</b>
	rp<re	31(60.8)	20(39.2)		18(35.3)	33(64.7)	
	rp=re=0	10(71.4)	4(28.6)		7 (50)	7(50)	

\*According to Bonferroni correction p-value=0.012 for rp>=re(>0) vs rp<re, p-value=0.006 for rp>=re(>0) vs rp=re=0 and p-value=1 for rp<re vs rp=re=0.



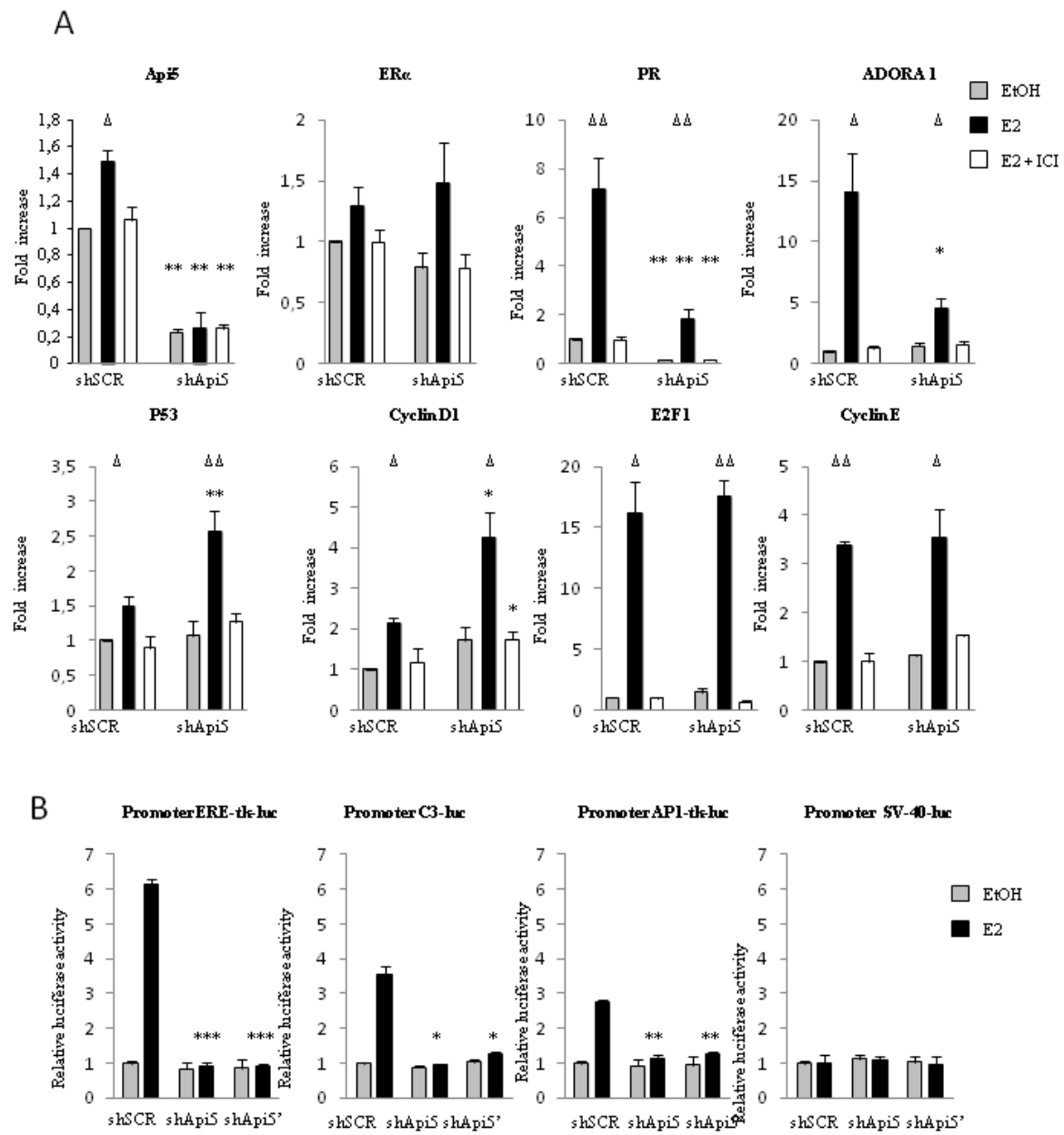
**FIGURE 2**



**Figure 2. Effect of Api5 knock down on anchorage independent growth and in vivo tumorigenicity**

**A.** Expression of Api5 mRNA detected by qRT-PCR in MCF7: shApi5 is significantly downregulated in regard to MCF7 shSCR (\*\*  $p < 0.01$ , student t test). **B.** Expression of Api5 detected by western blot in MCF7 shApi5 is significantly downregulated in regard to MCF7 shSCR. **C.** Expression of Api5 detected by immunohistochemistry (OM, x200) in MCF7 shApi5 shows 2% of nucleus stained in regard to 80% of nucleus stained in MCF7 shSCR. **D.** Soft agar colony formation of MCF7 shApi5 compared to MCF7 shSCR cell lines. The graph shows the number of colonies (mean + sd) after 15, 21, 28, 35 days of three independent experiments of the MCF7 shSCR (grey column) compared to the MCF7 shApi5 (black column). The p values were determined by a student t test (\* $p < 0.05$ \*\* $p < 0.01$ ). Shown at the right are representative images (OM, x 40) of the colonies formed by each sh MCF7 type cell at 35 days. **E.** Tumor growth rate of MCF7sh injected subcutaneously in nude mice measured in  $\text{mm}^3$ . The growth of MCF7 shSCR (grey curve, data are means + sd of tumor growth in 4 independent mice) is compared to the growth of the MCF7 shApi5 (black curve, data are means +sd of tumor growth in 5 independent mice).  $P < 0.001$  (determined by student t test) for each measure. **F Left:** The picture of the mice represents for each tumor type the most important tumor that grew subcutaneously.  $966 \text{ mm}^3$  for MCF7 shSCR and  $173 \text{ mm}^3$  for MCF7 shApi5. **Right:** Histologie of the two type of tumors (HE stained, OM X200). **G.** quantification of Api5 expression in nuclei of both cell type by immunochemistry and optic microscopy. Data are expressed by the mean + sd with a mean of 97% of nucleus stained for Api5 in the MCF7 shSCR cell line and a mean of 68% for the MCF7 shApi5 (comparison of the result is significant with a  $p^{**} < 0.001$  value determined by a student t test). On the right two representatives pictures of the percentage of stained nuclei in both tumor type with the Api5 antibody in OM X100.

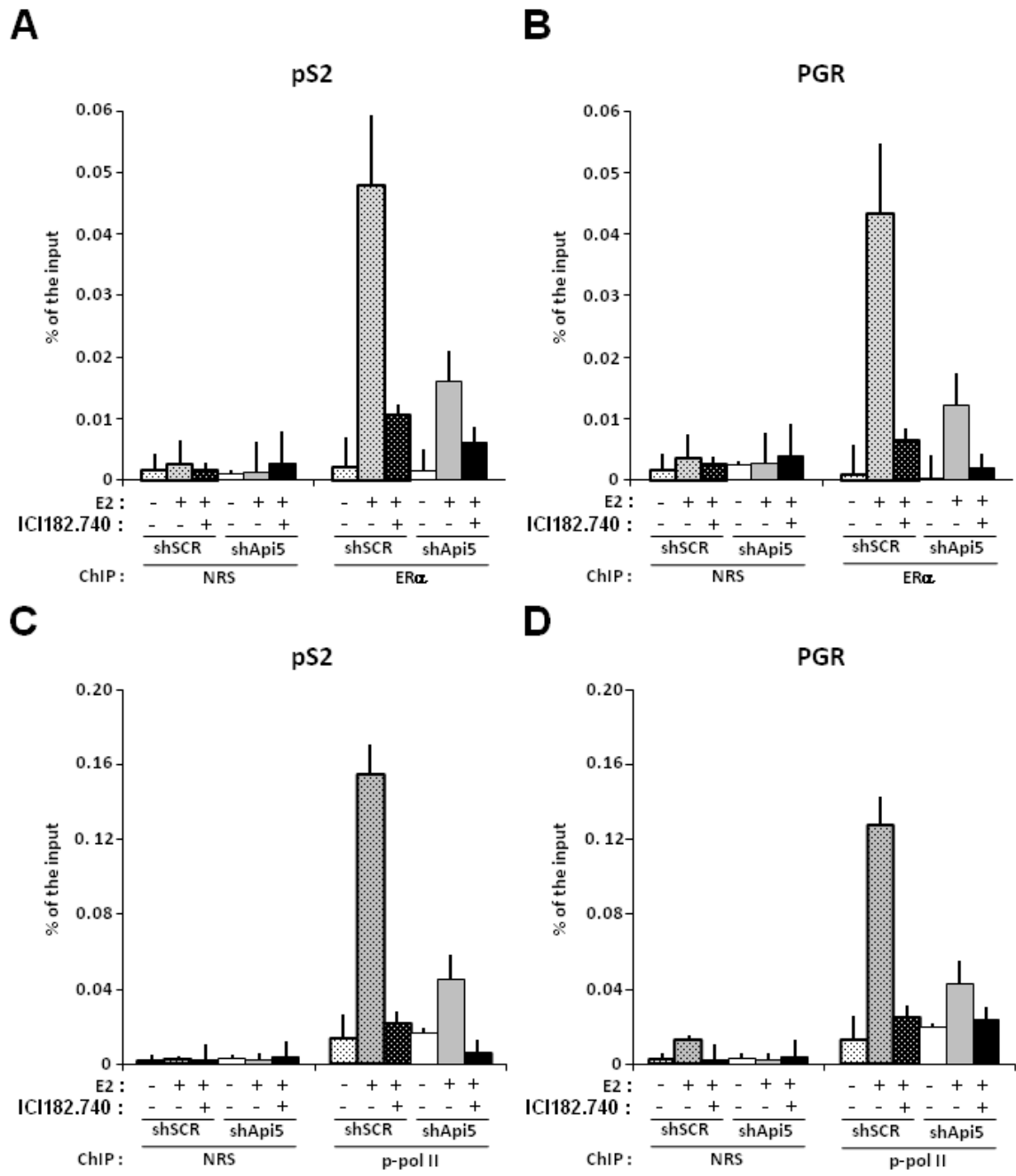
**FIGURE 3**



**Figure 3. Api5 regulates ER $\alpha$  signaling downstream target genes on ERE and Ap1 promoters.** **A.** MCF7 shSCR and MCF7 shApi5 cell lines were treated as described in materials and methods for defined estrogen culture. They were treated with EtOH 0.1% (grey column), with E2 10nM (Black column) and E2+ICI 182780 100nM (white column). After 24 hours of treatment mRNA was extracted and Api5, ER $\alpha$ , PR, ADORA 1, p53, cyclin D1, E2F1, cyclin E, relative mRNA levels were measured by quantitative PCR, using GUSB mRNA levels as references. Triangle  $\Delta < 0.05$  and  $\Delta\Delta p < 0.01$  indicate a significant increase of mRNA under E2 treatment compared to control EtOH and E2+ICI. Asterisks\*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  indicate a significant decrease or increase of mRNA of the MCF7 shApi5 compared to the MCF7shSCR for each of the three treatments. **B.** Luciferase experiments were performed in MCF7 shSCR, Api5, Api5' cells co-transfected with a plasmid encoding the firefly luciferase under the control of the ERE-tk, C3, and AP1-tk promoter or SV-40 promoter for control and a pRL-CMV encoding the Renilla luciferase for normalization. The three MCF7 sh cell line were treated with EtOH 0.1% (grey column) and E2 10nm (black column). Asterisks\*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$  indicate a significant decrease of the luciferase activity for the shApi5, shAPI5' compared to the shSCR. Statistical significance was determined by two-tailed Student's t test.



**FIGURE 4**



#### Figure 4

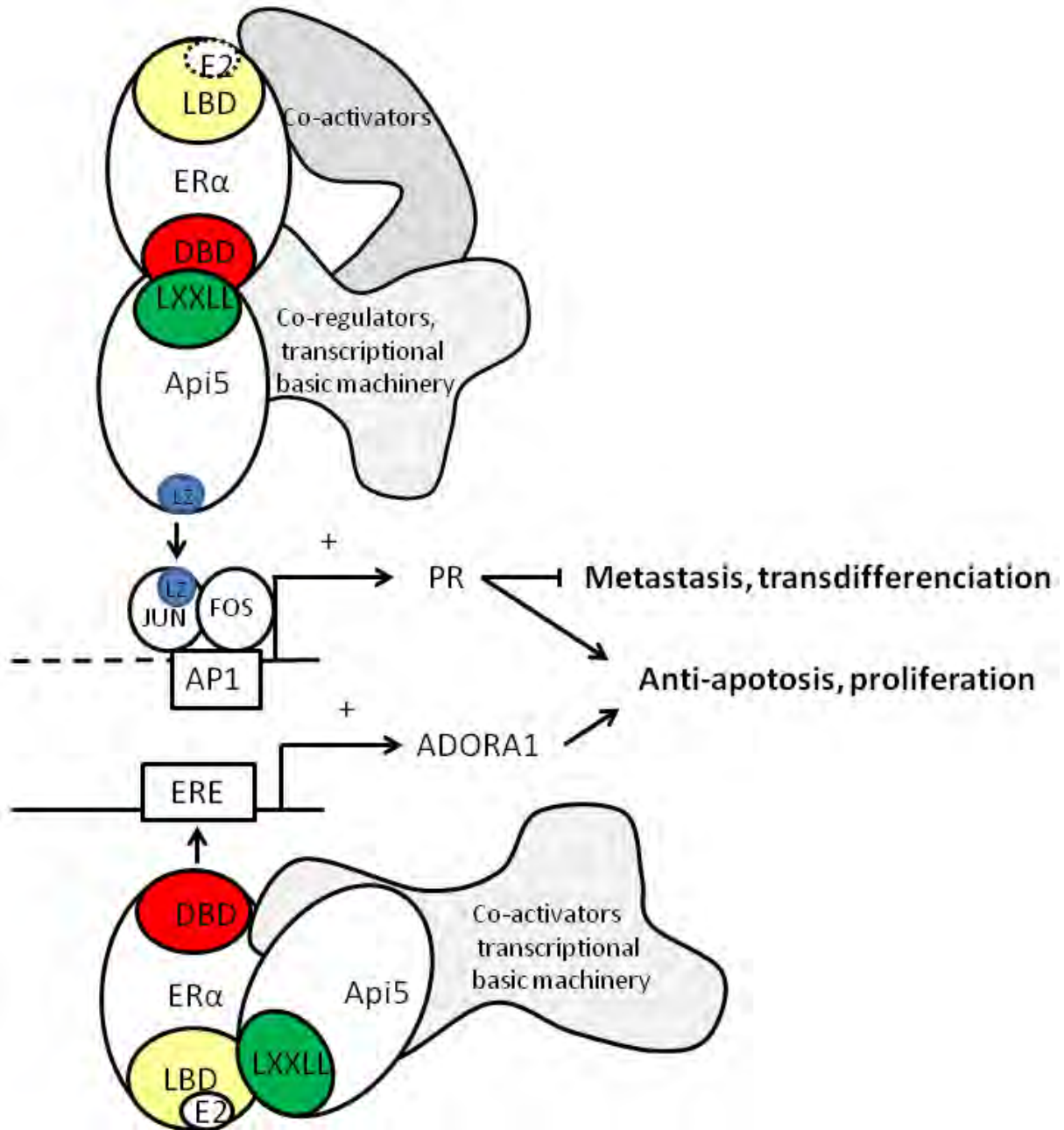
**Figure 4. Api5 is necessary for ER and pol II association to specific gene target promoters.** A. B ER $\alpha$  ChIP experiment. Enrichment of PS2 (A) and PR (B )promoters (% of input) after immunoprecipitation with ER $\alpha$  antibody. MCF7 cells were stably transfected with sh API5 or shSCR (control). Chromatin immunoprecipitations were done using an anti-ER $\alpha$  polyclonal rabbit antibody (ChIP ER $\alpha$ ) or with normal rabbit serum (CHIP NRS). PCR amplified regions of the albumin promoter were used as a negative control. The ChIP results were obtained from 3 independent experiments. C.D PolII ChIP experiment. Enrichment of PS2 (C) and PR (D) promoters (% of input) after immunoprecipitation with Pol II antibody. MCF7 cells were stably transfected with sh API5 or shSCR (control). Chromatin immunoprecipitations were done using an anti-Pol II polyclonal rabbit antibody (ChIP Pol II) or with normal rabbit serum (CHIP NRS). PCR amplified regions of the albumin promoter were used as a negative control. The ChIP results were obtained from 3 independent experiments.



**Figure 5 Api5 interacts directly with ER $\alpha$**  **A**-Secondary structure of Api5. A LXXLL (L102- L106) motif is present in the N-terminal end of the protein. This kind of motif is known to interact with nuclear receptor. **B-top** : Api5 and ER $\alpha$  are expressed in MCF7 cells **B-bottom**: Immunoprecipitation of endogenous Api5 co-immunoprecipitate ER $\alpha$ .**C**-Co-immunoprecipitation of Api5 tagged HA with or without a mutation of LXXAA vs LXXLL expressed in MCF7 cells. The LXXLL is necessary for the Api5/ ER $\alpha$  binding. **D**-GST pull down : The ER $\alpha$ -GST mutants and Api5 recombinant protein were expressed and incubated together and their in vitro interaction was checked on a Western Blot. The Api 5 protein binds to the C DNA domain (DNA Binding Domain) of ER $\alpha$ .

Figure 6

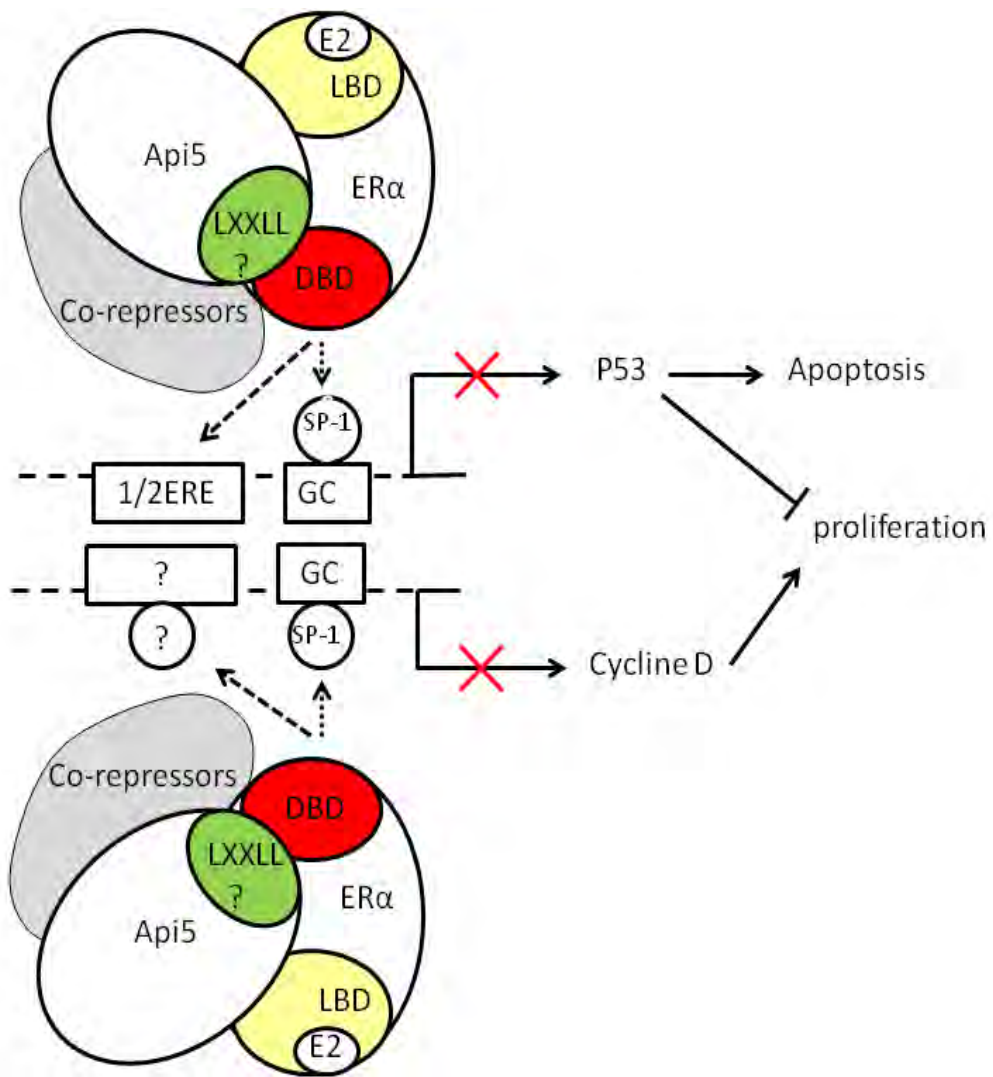
A



**Figure 6 . Two proposed models explaining how Api5 might regulates ER $\alpha$  signaling.**

**A. Api5 acts as a co-activator in ER $\alpha$  signaling.** Top-To regulate the transcription of genes such as *PR* on an AP1 site: ER $\alpha$  liganded or not to E2 will associate through its DBD domain to Api5 LXXLL. This complex will recruit other co-regulators and will stimulate *PR* transcription leading to proliferation, and inhibiting apoptosis, and perhaps transdifferentiation and metastasis. Bottom- For gene such as *ADORA1* on ERE sites: ER $\alpha$  in the presence of E2 will associate through its LBD domain to Api5 LXXLL. This complex will recruit other co-activators and will stimulate *ADORA1* transcription leading to proliferation and inhibiting apoptosis

**B**



**Figure 6. Two proposed models explaining how Api5 might regulates ER $\alpha$  signaling. A. Api5 acts as a co-activator in ER $\alpha$  signaling.**

**B. Api5 acts as a co-repressor in ER $\alpha$  signaling** Top-To regulate the transcription of genes such as *p53*: ER $\alpha$  liganded to E2 will associate through its DBD domain to Api5 LXXLL on a *p53* SP1 site and/or a *p53* half ERE site. This complex will recruit other co-repressors and will inhibit *p53* transcription leading to inhibition of apoptosis and perhaps to a positive impact on proliferation. Bottom- For genes such as *cyclin D1*: ER $\alpha$  liganded to E2 will associate through its DBD domain to Api5 LXXLL on a *cyclin D1* SP1 site and/or other transcription factor sites. This complex will recruit other co-repressors and will inhibit *cyclin D1* transcription leading to a negative impact on proliferation



**Table materials and methods. Summary of clinicopathological and molecular features of 81 breast cancer patients.**

	<b>Number</b>	<b>%Patients</b>
<b>Number of patients</b>	81	100
<b>Age at surgery of primary tumor</b>		
<52 years	19	23
≥52 years	62	77
<b>Tumor size</b>		
T1≤2 cm	48	60
2<T2≤5 cm	27	33
T3>5cm	6	7
<b>Lymph node</b>		
negative	45	56
positive	36	44
<b>histological type</b>		
ductal	66	82
lobular	14	17
medullary	1	<1
<b>Grade</b>		
I	13	16
II	44	54
III	24	30
<b>ER</b>		
Positive	67	83
Negative	14	17
<b>PR</b>		
Positive	52	64
Negative	29	36
<b>HER2/neu</b>		
Amplified	12	15
Non amplified	69	85
<b>Molecular classification</b>		
Luminal A	56	69
Luminal B	11	13
HER2-enriched	7	9
Triple-negative	7	9

## REFERENCES

1-Ferlay j, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. (2008). Cancer incidence and mortality world wide: IARC CancerBase No. 10. Eds. GLOBOCAN v1.2. [Internet], Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (<http://globocan.iarc.fr>)

2-Colditz GA, Rosner B. (2000). Cumulative risk of breast cancer to age of 70 years according to risk factor status: data from the Nurse'Health Study. *Am J Epidemiol* 152: 950-964

3-Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. *Contraception* 54:1S-106S; Beral V. (2003). Breast Cancer and hormone replacement therapy in the Million Woman study. *Lancet* 362: 419-427

4- Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AH, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, Blamey RW, Ellis IO. (2008). Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 26: 3153-8

5-Michaelson JS, SilversteinM, Sgroi D, Cheongsiatmoy JA, Taghian A, Powell S, Hughes K, Comegno A, Tanabe KK, Smith B. (2003). The effect of tumor size and lymph node status on breast carcinoma lethality. *Cancer* 98: 2133-2143

6- Lakhani, S.R, Ellis.I.O., Schnitt, S.J, Tan, P.H, van de Vijier, M.J. (2012).WHO Classification of tumors, volume 4

7- Allred DC. (2010). Issues and updates: evaluating oestrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol* 23 Suppl 2: S52-S59

8- Chang JC, Hilsenbeck SG. (2010). prognostic and predictive markers. In: Lippman ME, Morrow M, Osbourne CK eds. *Wolter Kluwer Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia*: 443-457.

9- Couse JF, Korach KS. (1999). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol* 60 : 143-8

10-Mallepell S, Krust A, Chambon P, Brisken C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2196–22014

11-Russo J, Russo IH. (2006).The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102: 89–96

12- Feng Y, Manka D, Wagner KU, Khan SA. (2007). Estrogen receptor- $\alpha$  expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 14718–14723

13- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925–5930.

14- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49–53.

15- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. (2006). International union of pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58: 773–81.

16- Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol* 51: 55-67

17-Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA. (2003). Estrogen Receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a ‘Ying Yang’ relationship between ERalpha and ERbeta in Mice. *Mol Endocrinol* 17: 203–208

18-Lin CY, Strom A, Li Kong S, Kietz S, Thomsen JS, Tee JB et al. (2007). Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 9: R25

19- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* 15: 1292–300

20- Nilsson S, Gustafsson JA. (2002). Estrogen receptor action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 12: 237–257

- 21- Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3: 513–9.
- 22- Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 46: 1053-61
- 23- Webb P, Lopez GN, Uht RM & Kushner PJ. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway. *Molecular Endocrinology* 9: 443–456
- 24- Safe S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitamins and Hormones* 62 231–252
- 25- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20: 321–44
- 26- Klinge CM, Jernigan SC, Smith SL, Tyulmenkov VV & Kulakosky PC. (2001). Estrogen response element sequence impacts the conformation and transcriptional activity of estrogen receptor  $\alpha$ . *Molecular and Cellular Endocrinology* 174: 151–166
- 27- McKenna NJ, O'Malley BW. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465–74

- 28- Metivier R , Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115: 751–63
- 29- Windahl SH, Treuter E, Ford J, Zilliacus J, Gustafsson JA, McEwan IJ. (1999). The nuclear-receptor interacting protein (RIP) 140 binds to the human glucocorticoid receptor and modulates hormone-dependent transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 71: 93-102
- 30- Peterson TJ, Karmakar S, Pace MC, Gao T, Smith CL. (2007). The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) corepressor is required for full estrogen receptor alpha transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 27: 5933–48
- 31- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103: 843-52
- 32- Taatjes DJ. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35: 315-22
- 33- Auboeuf D, Höning A, Berget SM, O'Malley BW. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298: 416-9.
- 34- Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 6: 307-16

35-Hall JM, McDonnell DP. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5 : 343-57

36- Merrell KW, Crofts JD, Smith RL, Sin JH, Kmetzsch KE, Merrell A, Miguel RO, Candelaria NR and Lin C-Y.(2011). Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene* 30: 1608–1614

37-Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. (2000). Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem* 275: 35848-56.

38-Norris JD, Fan D, Sherk A, McDonnell DP. (2002). A negative coregulator for the human ER. *Mol Endocrinol* 16: 459-68

39-Laherty CD, Billin AN, Lavinsky RM, Yochum GS, Bush AC, Sun JM, Mullen TM, Davie JR, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Ayer DE, Eisenman RN. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* 2: 33-42

40-Kim J, Park UH, Moon M, Um SJ, Kim EJ. (2013). Negative regulation of ER $\alpha$  by a novel protein CAC1 through association with histone demethylase LSD1. *FEBS Lett* 587: 17-22

41-Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736

42- Torchia J, Rose D. W, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass C. K, and Rosenfeld M. G. (1997). *Nature* 387: 677–684

43- Savkur RS, Burris TP.(2004).The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 63: 207-12

44-Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 12: 513–524

45- Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG.(1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13: 3198-208

46-Varlakhanova N, Snyder C, Jose S, Hahm JB, Privalsky ML.(2010).Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol Cell Biol* 30: 1434-45

47-Tewari M, Yu M, Ross B, Dean C, Giordano A, Rubin R. (1997). AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res* 57: 4063-4069



48-Van den Berghe L, Laurell H, Huez I, Zanibellato C, Prats H, Bugler B.(2000). FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol Endocrinol* 14: 1709-1724

49-Morris EJ, Michaud WA, Ji JY, Moon NS, Rocco JW, Dyson NJ (2006) Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet* 2: e196

50-Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F, Poyet JL (2009) The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J* 28: 1576-1588

51-Garcia-Jove Navarro M, Basset C, Arcondéguy T, Touriol C, Perez G, Prats H, Lacazette E. Api5 Contributes to E2F1 Control of the G1/S Cell Cycle Phase Transition. *PLoS One*. 2013 8: e71443

52-Kim JW, Cho HS, Kim JH, Hur SY, Kim TE, et al. (2000) AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest* 80: 587–594

53-Sasaki H, Moriyama S, Yukiue H, Kobayashi Y, Nakashima Y, et al. (2001) Expression of the antiapoptosis gene, AAC-11, as a prognosis marker in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 34: 53–57

54-Clegg N, Ferguson C, True LD, Arnold H, Moorman A, et al. (2003) Molecular characterization of prostatic small-cell neuroendocrine carcinoma. *Prostate* 55:55–64

55-Krejci P, Pejchalova K, Rosenbloom BE, Rosenfelt FP, Tran EL, et al. (2007)The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2,are up-regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *J Leukoc Biol* 82: 1363–1364

56- Koci L, Chlebova K, Hyzdalova M, Hofmanova J, Jira M, Kysela P, Kozubik A, Kala Z, Krejci P. (2012). Apoptosis inhibitor 5 (API-5; AAC-11; FIF) is upregulated in human carcinomas in vivo.*Oncol Lett* 3: 913-916

57- Wang Z, Liu H, Liu B, Ma W, Xue X, et al. (2010) Gene expression levels of CSNK1A1 and AAC-11, but not NME1, in tumor tissues as prognostic factors in NSCLC patients. *Med Sci Monit* 16: CR357–364

58- Jansen MP, Foekens JA, van Staveren IL, Dirkzwager-Kiel MM, Ritstier K, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Sieuwerts AM, Portengen H, Dorssers LC, Klijn JG, Berns EM (2005) Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23: 732-740

59 - Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdy P, Zhou M, Bossard C, Bugler B, Bayard F, Krust A, Prats AC, Doetschman T, Prats H, Arnal JF (2004) Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ Res* 94: 1301-1309

60-Plevin MJ, Mills MM, Ikura M (2005) The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 30: 66-69

- 61- Han BG, Kim KH, Lee SJ, Jeong KC, Cho JW, Noh KH, Kim TW, Kim SJ, Yoon HJ, SuhSW, Lee S, Lee BI (2012) Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules. *J Biol Chem.* Mar 30;287(14):10727-37
- 62-Li X, Gao X, Wei Y, Deng L, Ouyang Y, Chen G, Zhang Q, Wu C. (2011). Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration. *Plant Cell* 23: 1416-1434
- 63-Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ.(2009) Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* 325: 1240-3
- 64-Lipponen P. (1999). Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer* 6: 13-6
- 65-Lee HT, Gallos G, Nasr SH, Emala CW. (2004). A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 15:102-11
- 66- Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, Liu S.(2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther* 4: 1355-60

67-Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. (2007).Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide invitro: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands Brain Res. 1132: 193-202

68-Xiang F, Huang YS, Zhang DX, Chu ZG, Zhang JP, Zhang Q. (2010). Adenosine A1 receptor activation reduces opening of mitochondrial permeabilitytransition pores in hypoxic cardiomyocytes. Clin Exp Pharmacol Physiol 37: 343-9.

69-Vousden KH, Prives C. (2009).Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53 Cell 137: 413-31

70-Obr AE, Edwards DP.( 2012).The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer Mol Cell Endocrinol 357: 4-17

71-Al Saleh S, Al Mulla F, Luqmani YA.(2011). Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. PLoS One 6: e20610

72-Lin Z, Reierstad S, Huang CC, Bulun SE. (2007). Novel Estrogen Receptor- $\alpha$  Binding Sites and Estradiol Target Genes Identified by Chromatin Immunoprecipitation Cloning in Breast Cancer. Cancer Res 67: 5017-5024

73-Petz LN, Ziegler YS, Schultz JR, Nardulli AM. (2004). Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. Mol Endocrinol 18: 521-32.

74-Bonéy-Montoya J, Ziegler YS, Curtis CD, Montoya JA, Nardulli AM. (2010). Long-range transcriptional control of progesterone receptor gene expression. *Mol Endocrinol* 24: 346-58

75- Gu G, Barone I, Gelsomino L, Giordano C, Bonofiglio D, Statti G, Menichini F, Catalano S, Andò S (2012). Oldenlandia diffusa extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ER $\alpha$ /Sp1-mediated p53 activation. *J Cell Physiol* 227: 3363-72

76-Berger CE, Qian Y, Liu G, Chen H, Chen X. (2012). P53, a target of estrogen receptor (ER)  $\alpha$ , modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *J Biol Chem* 287: 30117-27

77-Castro-Rivera E, Samudio I, Safe S. (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem* 276: 30853-61

78-Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price RH Jr, Pestell RG, Kushner PJ.(2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 277: 24353-60

79- Elston CW, Ellis IO.(1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403-410

80- Edge SB, Byrd DR, eds (2010). *AJCC cancer staging manual*. 7th eds. Springer

81-Birnbaum DT, Kosmala JD, Henthorn DB, Brannon-Peppas L.( 2000). Controlled release of beta-estradiol from PLAGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J Control Release* 65: 375-87

## **II-Résultats complémentaires**

### **1- Api5 interagit avec d'autres facteurs intervenant dans la transcription**

Dans d'autres travaux qui visaient à établir un lien entre Api5 et les cellules endothéliales dans le cadre de la thématique de l'équipe sur l'angiogénèse et en raison de son partenariat avec le FGF-2 (Van den Berghe et al, 2000) nous avons effectué un crible par biacore et une analyse en spectrométrie de masse sur des cellules ABAE (Adulte Bovine Endothelial Cells) à la recherche de partenaires d'Api5 (tableau 5).

**Tableau 5: Api5 est lié à des facteurs en relation avec la transcription, avec l'ER et avec des protéines du métabolisme énergétique (voir page ci-contre)**

Protéines interagissant avec Api5	Type de protéine et fonction	Score	Nombre de peptides
ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	Protéine transporteur intervient dans le métabolisme énergétique Leur portion F1 est similaire aux DNA hélicases hexamériques	543.5	12
ATP synthase alpha chain heart isoforme chain, mitochondrial precursor		367.2	8
ADP/ATP translocase 3	protéine transporteur	152.6	6
Elongation factor 1-alpha 1	Facteur d'élongation impliqué dans l'exportation-transcription dépendante, des ARNt et des protéines- (Khacho et al 2008) Interagit avec « breast cancer metastasis suppressor », œstrogène sulfotransférase. rôle dans le cycle cellulaire	152.3	5
hnRNP A2/B1	Ribonucléoprotéine Régulation des nucleobases, nucléosides, nucléotides et au métabolisme des acides nucléiques	76.7	1
hnRNP A1		68.0	1
Histone H4	Lie l'ADN-Régulation des nucleobases, nucléosides, nucléotides et du métabolisme des acides nucléiques	153	5
Histone H2B		131.9	4
40S ribosomal protein S19 (lie le FGF-2)	Constituant du ribosome Métabolisme protéique	173.3	8
40S ribosomal protein S10		170.9	5
Heat shock protein HSP 90	Séquestre le RE dans le cytoplasme sous forme inactive	250.4	7
L-lactate deshydrogenase A chain	Activité deshydrogénase catalytique Métabolisme énergétique	322.4	11
Enolase alpha		236.1	7



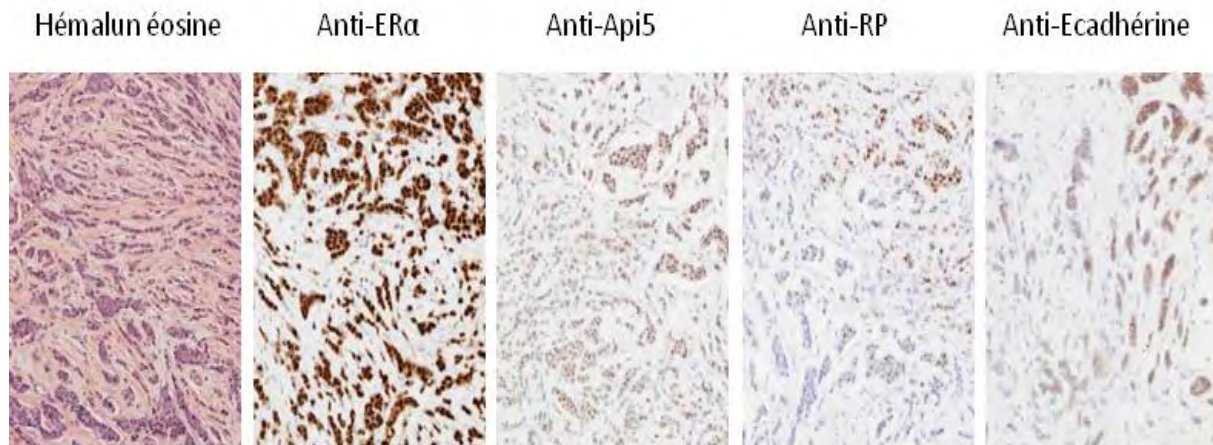
La grande majorité des protéines que nous avons détectées grâce à cette étude sont des protéines liées à l'ADN ou à l'ARN et impliquées dans les processus transcriptionnels à proprement parler mais aussi dans le transport et la maturation des ARN. Nous avons également retrouvé des ATP synthétases mitochondriales. (Les rôles et fonctions des protéines ont été analysés sur la Data Base de Human protein reference [www.hprd.org](http://www.hprd.org)). Par ailleurs l'interaction entre Api5 et l' heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1/B2 (hnRNP A1/B2) et la protéine ribosomale 19 (RPS-19) a été retrouvée par co-immunoprécipitation endogène avec Api5 sur des MCF7 (résultat non présenté). Il est également intéressant de remarquer l'interaction d'Api5 avec HSP90 puisque cette dernière est connue pour séquestrer l'ER dans le cytoplasme.

## **2-Cas particuliers**

### **Premier cas particulier : Api5 est associé à la perte de l'E-cadhérine : à propos d'un cas**

Nous avons dans notre série un carcinome canalaire de grade III dont l'expression d'ER $\alpha$  concernait 100% des noyaux et était d'intensité +++ et l'expression de PR concernait 60% des noyaux et était d'intensité +++. Ce carcinome était négatif pour Her-2. En ce qui concerne Api5, son expression était forte avec une intensité de ++++ dans 100% des noyaux dans les territoires où les cellules s'agençaient en amas et plus faible avec une intensité de ++-+++ dans 100% des noyaux dans les territoires où les cellules s'agençaient en cordons. Ce carcinome ne présentait pas de métastases ganglionnaires au moment du diagnostic. De façon intéressante ce carcinome montre une perte de PR et d'Api5 dans les zones cordonales. Cette perte d'expression est associée à une perte d'expression dans ces mêmes territoires de l'E-cadhérine (Figure 43). Or la perte d'expression de l'E-cadhérine est un marqueur potentiel de la transition épithélio-mésenchymateuse (Planas-Silva et al, 2007) qui est un phénomène supposé impliqué dans l'invasion et la métastase (Obr et Edwards, 2012). Ce cas particulier

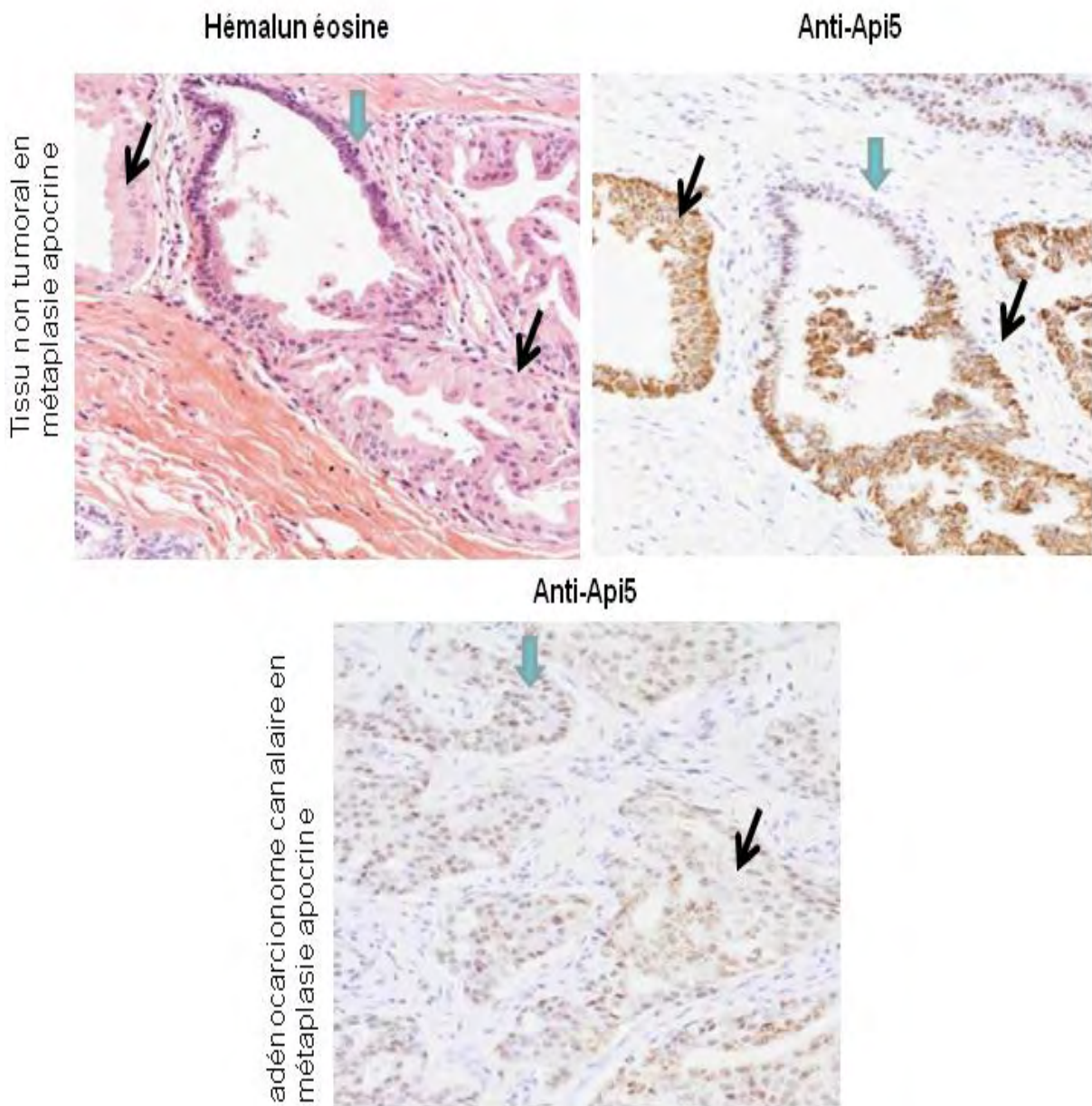
nous permet de penser qu'Api5 pourrait aussi réguler l'E-cadhérine et donc la disparition d'Api5 pourrait par ce biais favoriser le processus de transition épithélio-mésenchymateuse.



**Figure 43. L'expression d'Api5, de PR et de l'E-cadhérine est diminuée dans les territoires cordonaux par rapport au territoire où les cellules sont en amas.** Les tissus ont été prélevés et fixés dans du formol à 4% moins de deux heures après l'exérèse chirurgicale de la pièce. Au bout de 24 heures, ils ont été inclus en paraffine puis ont été préparés afin d'être soit colorés en hémalun éosine soit marqués en immunohistochimie par les anticorps anti ER $\alpha$  (DAKO), PR (DAKO), E-cadhérine (DAKO) et Api5 polyclonal (Abcam). Les photographies représentent : la tumeur colorée en hémalun éosine et les 4 marquages avec les 4 anticorps dans des territoires d'architecture similaire et représentatif de l'ensemble du carcinome. Photographies au grossissement X 200.

**Deuxième cas particulier : Api5 s'exprime de façon granulaire et cytoplasmique dans le cytoplasme des cellules non tumorales en métaplasie apocrine et les carcinomes apocrines.**

Nous avons observé sur 4 cas différents où le tissu épithélial mammaire était en métaplasie apocrine une relocalisation d'Api5 dans le cytoplasme des cellules métaplasiques. Les cellules métaplasiques présentaient un marquage d'Api5 cytoplasmique granulaire d'intensité forte et parallèlement on observait une diminution son expression nucléaire. Nous avons également dans notre série un carcinome en métaplasie apocrine de grade III, qui exprimait faiblement Api5 et n'exprimait ni ER, ni PR ni Her-2. Ce carcinome était métastatique au niveau d'une adénopathie au moment du diagnostic. De la même manière que pour les tissus non tumoraux, on observe une relocalisation cytoplasmique granulaire d'Api5 et parallèlement une diminution de son expression nucléaire. Dans le carcinome, l'intensité cytoplasmique d'Api5 est plus faible que celle observée dans les tissus non tumoraux métaplasiques comme nous l'avons déjà observé lorsqu'il est en position nucléaire (Fig 44). Il a été montré par des analyses ultra-structurales que ces granules dans les métaplasies apocrines correspondaient à des mitochondries en excès (Damiani et al, 1998) (Roddy et al, 1980). Ainsi lorsqu'il y a des mitochondries en excès, il semblerait qu'elles captent Api5 aux dépens du noyau. Cela est à mettre en relation avec nos résultats sur le crible ABAE où nous avons trouvé des ATPsynthases mitochondriales comme potentiel partenaire d'Api5. Ces ATP synthases mitochondriales sont décrites comme un modèle d'évolution dans lequel deux unités se sont associées pour gagner de nouvelles fonctions. Le domaine dit F0 est un domaine similaire au complexe de propulsion de certaines bactéries et le domaine dit F1 est similaire à celui des hélicases hexamériques. Api5 étant une protéine apparemment dotée de plusieurs fonctions, il est donc fort possible qu'il intervienne aussi au niveau mitochondrial.



**Figure 44. Expression cytoplasmique d'Api5 :** Haut- cellules épithéliales non tumorales en métaplasie apocrine (flèches noires). Cellules épithéliales non métaplasique (flèches bleues) Bas-Carcinome en métaplasie apocrine (flèches noires), cellules carcinomateuses non en métaplasie (flèches bleues). On observe une relocalisation d'Api5 dans le cytoplasme et une perte d'Api5 dans les noyaux des cellules en métaplasie apocrine.

**III Contribution au travail de thèse de Marina GARCIA-JOVE  
NAVARRO : Régulation de l'activité transcriptionnelle du facteur E2F1  
par Api5**

**Garcia-Jove Navarro M, Basset C, Arcondéguy T, Touriol C, Perez G, Prats H, Lacazette E. (2013). Api5 Contributes to E2F1 Control of the G1/S Cell Cycle Phase Transition. *PLoS One* : 8(8).**



## **SYNTHESE : résultats, discussion, conclusion et perspectives**

### **1-Api5 régule la transcription de gènes cibles d'ER $\alpha$ impliqués dans l'apoptose**

Api5 est une protéine dont la principale fonction connue est d'être anti-apoptotique (Tewari et al, 1997). A ce jour, il a été montré qu'Api5 inhibe l'apoptose induite par E2F1 et qu'il agirait plutôt en aval de l'activation transcriptionnelle dépendante d'E2F1 (Morris et al, 2006). Dans ce sens, il a été montré récemment dans un modèle cellulaire d'ostéosarcome humain (U2OS) qu'Api5 en se liant à acinus le protégeait du clivage des caspases (Rigou et al 2009). Or acinus est un facteur nucléaire qui une fois clivé par les caspases est impliqué dans le phénomène pro-apoptotique de condensation chromatinienne (Sahara et al, 1999). De plus, toujours dans le même modèle cellulaire, les auteurs montrent que la déplétion d'Api5 est à l'origine d'une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements génotoxiques par l'étoposide et la camptothécine qui s'accompagne d'une augmentation de l'activité des caspases effectrices-7/3. Dans notre étude en cours de publication (Basset et al, 2014) nous montrons que la déplétion d'Api5 est à l'origine d'une dérégulation de l'expression de gènes cibles d'ER $\alpha$  ayant un rôle dans l'apoptose. En effet, sa déplétion entraîne une inhibition de l'expression d'*ADORA1* et de *PR*. Or *ADORA1* est connu pour ses propriétés anti-apoptotiques (Lee et al, 2004 ; Fatokun et al, 2007 ; Xiang et al, 2010) notamment dans le cancer du sein (Mirza et al, 2005). Concernant *PR*, il a été montré dans une étude sur l'apoptose et le cancer du sein que sa présence ainsi que celle d'ER $\alpha$  était associée à un index apoptotique inférieur à celui des cancers négatifs pour ces récepteurs (Lipponen et al, 1999). A l'inverse, la déplétion d'Api5 entraîne une sur-expression de p53 qui est connu pour être un facteur pro-apoptotique en réponse aux stress génotoxiques (Gu et al, 2012 ; Berger et al, 2012). Cet effet inverse sur p53 est donc lui aussi en faveur du rôle

anti-apoptotique d'Api5 via la signalisation d'ER $\alpha$ . Par ailleurs, nous avons montré conformément à la littérature (Garmi-Susini et al 2004) qu'ER $\alpha$  régulate l'expression d'Api5. Or ER $\alpha$  est lui aussi reconnu comme un facteur anti-apoptotique dont l'effet passe entre autre par bcl2. Cependant concernant l'implication d'ER $\alpha$  dans l'apoptose, il est intéressant de rappeler qu'il est aussi connu pour être pro-apoptotique. Pendant des années avant la découverte du Tamoxifène, les femmes ménopausiques atteintes de carcinomes mammaires ont été traitées par de fortes doses d'œstrogènes qui avaient un effet pro-apoptotique. Cet effet passe par Fas et FAS/L et par la voie mitochondriale (Lewis-Wambi et al, 2009). Or, chez le riz, il a été montré qu'Api5, lui aussi pouvait être pro-apoptotique (Li et al, 2011). Cependant cet effet d'Api5 chez le riz n'a pas, à ce jour, été démontré chez l'homme. En conclusion, nous proposons une troisième voie de régulation de l'apoptose par Api5 qui passe par la régulation de gènes pro ou anti-apoptotiques transcriptionnellement dépendant d'ER $\alpha$ . Afin de compléter cette étude il serait intéressant d'étudier l'effet d'Api5 sur l'activité des caspases 3 et 7 dans la lignée MCF7 en présence d'E2 mais aussi en présence d'antagonistes tels que le Tamoxifène et l'ICI et de traitements génotoxiques utilisés en pratique courante dans les cancers du sein comme par exemple les anthracyclines.

## **2- Api5 régule l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire**

Les études concernant le rôle prolifératif d'Api5 sont très peu nombreuses et aucune étude "in vivo" n'a encore été présentée. Dans les études de Morris et al 2006 et de Rigou P et al 2009, sur des lignées humaines d'ostéosarcome, la prolifération cellulaire et le cycle cellulaire ne sont pas affectés par des dérégulations de l'expression d'Api5. Par contre, dans notre étude précédente (Garcia Jove Navarro et al, 2013) sur une lignée humaine de cancer du poumon H1299 et sur une lignée de cancer du col de l'utérus (Hela), la déplétion d'Api5 était



à l'origine d'une accumulation des cellules en G1 et d'un ralentissement de la prolifération cellulaire. Dans cette première étude, comme dans celle que nous présentons actuellement, l'expression d'E2F1 qui est une cible d'ER $\alpha$  n'était pas perturbée. Néanmoins, l'expression de la cycline A qui dépend d'E2F1 pour sa transcription mais pas d'ER $\alpha$  était inhibée dans nos deux études, sur les Hela et les MCF7, par la déplétion d'Api5. En ce qui concerne les gènes qui dépendent des œstrogènes et qui jouent un rôle dans le cycle et la prolifération, la déplétion d'Api5 est à l'origine, dans notre étude sur les MCF7, d'une diminution de l'expression de RP et d'ADORA1 qui en plus de leur action anti-apoptotique ont une action pro-proliférative (Obr et Edwards, 2012 ; Mirza et al, 2005) et d'une augmentation de l'expression de p53 qui participe à l'arrêt du cycle cellulaire (Vousden et al, 2009). Cependant, la déplétion d'Api5 a été à l'origine d'une surexpression de la cycline D1 sous traitement E2 et E2+ICI. Or cette cycline exprimée pendant la phase G1 du cycle (Harbour et al, 1999) est un oncogène reconnu qui est particulièrement actif dans la carcinogénèse mammaire (Casimiro et al, 2014). Ce résultat différent de celui obtenu lors de notre précédente étude sur les Hela pourrait être une explication partielle des mécanismes cellulaires de résistance ou d'échappement thérapeutique dans les cancers du sein. En raison des actions opposées d'Api5 concernant les acteurs du cycle cellulaire dans les cellules MCF7 il est difficile de prévoir la fonction globale d'Api5 dans le cycle cellulaire et la prolifération dans cette lignée. En conclusion, l'action d'Api5 sur le cycle cellulaire et la prolifération semble dépendante du type cellulaire et donc moins puissante que son action anti-apoptotique qui a été retrouvée dans toutes les lignées cellulaires humaines analysées, quels que soient les mécanismes utilisés par Api5 pour parvenir à cette action. Ces constatations montrent la nécessité d'études complémentaires pour caractériser le rôle d'Api5 dans le cycle et la prolifération dans les cellules MCF7 et dans les carcinomes mammaires. Pour compléter cette partie du travail des études du cycle cellulaire sur les cellules MCF7 déplétées ou non pour

Api5 et traitées ou non par de l'E2 parallèlement à une étude de la prolifération dans ces différentes conditions sont à mettre au point. Néanmoins les effets prolifératifs in vitro du ER $\alpha$  étant particulièrement contradictoires (Koos, 2011), il serait peut être préférable d'envisager d'emblée des modèles in vivo pour analyser le rôle d'Api5 dans la prolifération médiée par l'ER $\alpha$ . Enfin, l'étude du Ki-67, marqueur de prolifération, serait aussi intéressante à corrélérer à l'expression d'Api5 sur notre série d'adénocarcinomes mammaires.

### **3- Api5 est nécessaire à la croissance tumorale**

La croissance tumorale de cellules MCF7, contrôles et inhibées pour Api5, greffées en sous-cutané à des souris nude et stimulées par des oestrogènes, a montré qu'Api5 était nécessaire au développement tumoral dans ces conditions. Il est intéressant de noter que des cellules ER $\alpha$  implantées dans des souris nude ne peuvent pas donner de tumeur s'il n'y a pas de stimulation par les oestrogènes (Price et al, 1990). En conclusion, l'expression d'Api5 comme celle d'E2, d'ER $\alpha$ , de P et de PR est donc indispensable, au moins, à l'initiation et au développement des tumeurs dans un premier temps (Obr et Edwards, 2012).

### **4- La perte d'expression d'Api5 est associée à l'invasion**

Les études de Rigou et al 2009 et Garmy-Susini et al, 2004 ont montré un effet pro-migratoire d'Api5. Or il a également été montré dans la littérature que le PR (Fu et al, 2010) et ADORA1 (Woodhouse et al, 1998) ont un rôle pro-migratoire in vitro. En ce qui concerne les œstrogènes et l'ER $\alpha$ , comme pour la prolifération, les résultats concernant la migration et l'invasion in vitro sont très contradictoires. Certaines études ont montré le rôle positif d'E2 et d'ER $\alpha$  sur la mobilité cellulaire (Thompson et al, 1988 ; Saji et al, 2005). D'autres études sur

des lignées de cancers du sein et d'ovaire ont montré un rôle inhibiteur d'E2 sur la mobilité et l'invasion et le rôle contraire pour les anti-oestrogènes (Rocheffort et al, 1998 ; Sisci et al 2004 ; Thompson et al ,1992; Platet et al, 1998).

Toujours est-il que *in vivo*, les cellules ER $\alpha$  implantées dans les souris nude, en présence d'E2, sont des tumeurs faiblement métastatiques par rapport aux tumeurs développées avec des lignées cellulaires ER $\alpha$  négatives (Price, 1990 a et b). De plus, la présence tant du ER $\alpha$  (Platet et al, 2004 ; Al Saleh et al, 2011) que du PR (Obr et Edward, 2012) dans les adénocarcinomes mammaires, est associée à un effet anti-métastatique et à une meilleure différenciation cellulaire. Or dans notre étude sur 81 adénocarcinomes du sein, nous avons observé que la présence de métastases ganglionnaires au moment du diagnostic du cancer est associée significativement à un niveau faible d'Api5, quel que soit le statut hormonal des patientes (analyse univariée cf table, article en cours de soumission). De plus, dans les cancers dits luminaux, où les deux récepteurs (ER $\alpha$  et PR) ou au moins un des deux récepteurs est présent, les femmes ayant des métastases ganglionnaires ont 4 fois plus fréquemment un niveau faible d'Api5 (analyses multivariées, résultats non présentés) que les femmes qui n'en ont pas. Ainsi le rôle apparemment anti-métastatique d'Api-5 dans les cancers du sein est en accord avec les rôles anti-métastatiques attribués à ER $\alpha$  et PR *in vivo*.

L'hypothèse expliquant le rôle anti-métastatique de PR propose que son expression s'éteigne uniquement pendant le temps de la transformation épithélio-mésenchymateuse (Obr et Edwards, 2012). Par analogie, on peut suggérer le même processus pour Api5 expliquant ainsi le paradoxe apparent : Api5 pro tumoral mais associé à un faible potentiel invasif des tumeurs. Etant donné qu'Api5 apparaît plutôt comme un facteur pro-migratoire, nous suggérons que son effet anti-invasif soit en relation avec d'autres aspects moléculaires de l'invasion et de la transition épithélio-mésenchymateuse comme la perte de molécules d'adhésion, par exemple l'E-cadhérine, qui est par ailleurs une cible connue d'ER $\alpha$

(Al Saleh et al, 2011). Cette hypothèse est illustrée dans notre étude par une tumeur qui présente dans des régions d'aspect plus invasif une perte de PR, d'Api5 et de l'E-cadhérine.

On peut aussi proposer, du fait du rôle pro-migratoire observé in vitro par Api5 et du fait qu'il n'y avait aucune tumeur complètement négative pour Api5, que les cellules exprimant Api5 sont celles qui métastasent et que la décroissance de l'expression sur l'ensemble de la tumeur est la conséquence de phénomènes plus indirects. La seule métastase (résultat non présenté) que nous ayons observée était fortement positive pour Api5 ce qui n'exclut aucune des 2 hypothèses proposées.

Des études complémentaires in vitro de migration et d'invasion sont donc nécessaires pour approfondir l'implication d'Api5 dans le processus métastatique et là encore, comme pour son rôle dans la prolifération, des études sur des modèles animaux semblent plus appropriées. Une étude prospective sur l'expression d'Api5 dans les métastases de cancers du sein permettrait peut être aussi d'appréhender les mécanismes d'invasion des tumeurs. Il serait également intéressant de réaliser une étude en double marquage d'Api5 avec l'E-cadhérine pour explorer le rôle d'Api5 dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

## **5-Api5 co-facteur de la transcription ER $\alpha$ dépendante**

### **5.1-Api5 est un co-activateur de la transcription ER $\alpha$ dépendante sur des sites de régulation ERE et AP1**

Dans notre étude, nous avons montré qu'Api5 interagissait avec ER $\alpha$  et le stabilisait sur son promoteur. Nous avons montré que le domaine LXXLL d'Api5 était nécessaire à cette liaison. Or ce motif est un motif classique de liaison pour une grande majorité de co-activateurs avec le domaine transactivateur AF-2 d'ER $\alpha$  dans la transcription ligand dépendante (Herry et al, 1997 ; Torchia et al, 1997; Savkur et al, 2004). Nous avons également montré qu'Api5 participait positivement à la transcription dépendante d'E2 spécifiquement sur les sites régulateurs ERE et AP1. L'analyse de l'expression endogène de gènes cibles d'ER $\alpha$  contenant des enhanceurs de ce type (ADORA1 et PR) allait dans le même sens. En conclusion, nous proposons qu'Api5 se lie par son motif LXXLL au domaine AF-2 d'ER $\alpha$  afin de le stabiliser sur son promoteur et de recruter des co-régulateurs permettant d'effectuer la transcription de gènes cibles d'ER $\alpha$  comportant spécifiquement des enhanceurs de type ERE et AP1 (figure 6 A, article Basset et al, 2014).

### **5.2 Api5 est un co-répresseur de la transcription ER $\alpha$ dépendante**

Nous avons également montré qu'Api5 se liait directement à un des domaines d'ER $\alpha$ . De façon assez attendue, il s'avère que le domaine que nous avons mis en évidence n'est pas le domaine AF-2 mais le domaine C d'ER $\alpha$  qui est le domaine de liaison à l'ADN du récepteur. Or, il a été montré que ce domaine était le domaine d'interaction avec le motif LXX I/H IXXX I/L de certains co-répresseurs tel que SMRT (Varlakhanova et al, 2010). De façon intéressante

les deux gènes cibles dont l'expression est inhibée par Api5, p53 et la cycline D1 semblent régulés par des enhanceurs autres que ERE et AP1 (Gu et al 2011; Berger et al, 2013 ; Castro-Rivera et al, 2013). Par analogie au mécanisme de liaison de SMRT avec ER $\alpha$ , je propose que lorsqu'ER $\alpha$  exerce son action via des facteurs de transcription tel que SP1, sa conformation induise l'interaction du LXXLL d'Api5 non pas avec son domaine AF-2 mais avec son domaine C. Api5 dans cette configuration recruterait non pas de multiples co-activateurs mais des co-represseurs à l'origine d'une inhibition de la transactivation d'ER $\alpha$  (figure 6 A, article Basset et al, 2014).

Le fait que nous n'ayons retrouvé que le domaine C en GST Pull down et pas le domaine AF-2 peut s'expliquer par le type d'expérience utilisé qui reste malgré tout assez éloigné de ce qui peut se passer en culture cellulaire ou in vivo. Et on peut aussi suggérer que la liaison d'Api5 avec le domaine C du ER $\alpha$  a une affinité plus forte que la liaison d'Api5 avec le domaine AF-2. Dans tous les cas, ce résultat n'est pas en contradiction avec le fait qu'Api5 puisse lier AF-2 via son motif LXXLL, de même que la liaison entre le motif LXXLL et AF-2 n'empêche pas qu'Api5 lie également le ER $\alpha$  par son domaine C. On ne peut pas non plus exclure qu'une seule de ces situations existe et qu'Api5 exerce ses activités co-activatrice et co-repressive via un seul de ces modèles.

Bien entendu, pour clarifier la situation de nouvelles études sur les interactions entre Api5 et ER $\alpha$  doivent être réalisées. Par exemple, il serait intéressant de refaire un GST pull down avec un lysat de MCF7 pour éliminer les biais de conformation pouvant être liés à la protéine recombinante, de faire un GST Pull down avec Api5 muté pour le domaine LXXLL. Il pourrait être intéressant de refaire les expériences de RT-qPCR dans des modèles cellulaires où ER $\alpha$  est muté pour AF-2 et le domaine C et de tester d'autres séquences régulatrices dépendantes d'ER $\alpha$ . Enfin, pour affiner le rôle d'Api5 sur les promoteurs de l'ER $\alpha$ , nous

devons rechercher d'autres partenaires moléculaires impliqués dans la transcription, par exemple par des expériences de Re-ChIP.

## **6-Api5 et le système mitochondrial**

Pour finir, nous discuterons de la relocalisation étonnante d'Api5 dans les métaplasies apocrines et dans les cancers en métaplasie apocrine du sein. Il a été montré par des études ultrastructurales que ces métaplasies correspondaient à des accumulations de mitochondries. (Diamiani et al, 1998 ; Roddy et al, 1980). Les analyses immunohistochimiques révèlent un marquage surtout nucléaire d'Api5 dans les tissus en général. Or, dans les tissus épithéliaux non-tumoraux ou cancéreux en métaplasie apocrine on observe une diminution de l'expression nucléaire d'Api5 et une expression nettement granulaire et cytoplasmique forte d'Api5. Il est intéressant de corréler cette observation microscopique au résultat du crible sur les ABAE où l'on avait retrouvé comme partenaires potentiels d'Api5, des ATP synthases mitochondriales. Api5 étant une protéine apparemment dotée de plusieurs fonctions, il est donc fort possible qu'elle intervienne également au niveau mitochondrial.

## CONCLUSION

Il s'agit de la première étude qui explore l'expression protéique d'Api5 in situ sur une série d'adénocarcinomes mammaires révélant ainsi un lien entre Api5 et le pronostic de ces tumeurs. C'est aussi la première étude qui montre, in vivo, qu'Api5 est nécessaire au développement tumoral. Enfin cette étude montre l'impact d'Api5 dans la régulation de la transcription dépendante d'ER $\alpha$  démontrant ainsi une nouvelle voie par laquelle Api5 exerce sa fonction anti-apoptotique. Enfin, nous proposons Api5 comme un nouveau co-facteur d'ER $\alpha$  dont l'action co-activatrice ou co-répressive dépendrait de son domaine d'interaction avec ER $\alpha$  lui même dépendant des séquences régulatrices du gène cible d'ER $\alpha$ .





## BIBLIOGRAPHIE

- Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 3: 364-373
- Ahel D, Horejsí Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ. (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*. 325: 1240-3
- Alexander DD, morimoto LM, mink PJ, Cushing CA (2010). A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. *Nutr Res Rev*. 23: 349-365
- Al Saleh S, Al Mulla F, Luqmani YA. (2011). Estrogen receptor silencing induces epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer cells. *PLoS One*. 6: e20610
- Ankrapp DP, Bennett JM, Haslam SZ. (1998). Role of epidermal growth factor in the acquisition of ovarian steroid hormone responsiveness in the normal mouse mammary gland. *J Cell Physiol*. 174: 251-60
- Ashkenazy H, Erez E, Martz E, Pupko T, Ben-Tal N. (2010). ConSurf 2010: Calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 38: W529–533
- Arnold SF, Melamed M, Vorojeikina DP, Notides AC, Sasson S. (1997). Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*. 11: 48-53
- Auboef D, Hönig A, Berget SM, O'Malley BW. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science*. 298: 416-9
- Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. (2003). Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol*. 21: 1973–9
- Baselga J, Bradbury I, Eidtmann H, Di Cosimo S, de Azambuja E, Aura C, Gómez H, Dinh P, Fauria K, Van Dooren V, Aktan G, Goldhirsch A, Chang TW, Horváth Z, Coccia-Portugal M, Domont J, Tseng LM, Kunz G, Sohn JH, Semiglazov V, Lerzo G, Palacova M, Probachai V, Puztai L, Untch M, Gelber RD, Piccart-Gebhart M; NeoALTTO Study Team. (2012). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet*. 379: 633-40
- Beatson GT. (1896). On the treatment of inoperable cancer of the mamma: suggestion for a new method of treatment with illustrative cases. *Lancet*. 2: 104–7
- Beleut, M, Rajaram RD, Caikovski M, Ayyanan A, Germano D, Choi Y, Schneider P, Briskin C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 2989–2994
- Benten WP, Stephan C, Lieberherr M, Wunde. (2001). Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology*. 142: 1669-77

- Beral V; Million Women Study Collaborators. (2003). Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 362: 419-27
- Berger CE, Qian Y, Liu G, Chen H, Chen X. (2012). P53, a target of estrogen receptor (ER)  $\alpha$ , modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *J Biol Chem*. 287: 30117-27
- Berry NB, Fan M, Nephew KP. (2008). Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol*. 22: 1535-51
- Bianchini M, Martinelli G, Renzulli M, Gonzalez Cid M, Larripa I. (2007). cDNA microarray study to identify expression changes relevant for apoptosis in K562 cells co-treated with amifostine and imatinib. *Cancer Chemother Pharmacol*. 59: 349-360
- Bocchinfuso WP, Korach KS. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2: 323-34
- Boffetta P, Couto E, Wichmann J, Ferrari P, Trichopoulos D, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Büchner FL, Key T, Boeing H, Nöthlings U, Linseisen J, Gonzalez CA, Overvad K, Nielsen MR, Tjønneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Lagiou P, Naska A, Benetou V, Kaaks R, Rohrmann S, Panico S, Sieri S, Vineis P, Palli D, van Gils CH, Peeters PH, Lund E, Brustad M, Engeset D, Huerta JM, Rodríguez L, Sánchez MJ, Dorronsoro M, Barricarte A, Hallmans G, Johansson I, Manjer J, Sonestedt E, Allen NE, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Jenab M, Mouw T, Norat T, Riboli E, Trichopoulou A. (2010). Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *J Natl Cancer Inst*. 102: 529-37
- Behrens D, Gill JH, Fichtner I. (2007) .Loss of tumorigenicity of stably ER $\alpha$ -transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 274: 19–29
- Brisken C, Rajaram RD. (2006). Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 11: 239-48
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389: 753-8
- Buyse M, Loi S, Van't VL, Viale G, Delorenzi M, Glas AM. (2006). Validation and clinical utility of a 70 gene prognostic signature for women with node negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 98: 1183-1192
- Cazzaniga M, Bonanni B. (2012). Breast cancer chemoprevention: old and new approaches *J Biomed Biotechnol*. 50: 112-115
- Casimiro MC, Velasco-Velázquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. (2014). Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin Investig Drugs*.
- Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*. 19: 1002-15

Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325: 834-840

Clarke. (2003). Steroid receptors and proliferation in the human breast. *Steroids*. 68: 789-794

Colditz GA, Rosner B (2000). Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status : data from the Nurses'Health study. *Am J Epidemiol*. 152: 950-964

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1996). Breast cancer and hormonal contraceptives: further results. *Contraception*. 54: 1S-106S

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast cancer. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52 705 women with breast cancer and 108 411 women without breast cancer. *Lancet*. 350: 1047-59

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*. 87: 1234-45

Collins LC, Schnitt SJ, Breast, Histology for pathologists, Stacey E Mills, 3eme ed, 2007 : 55-72

Come SE, Buzdar AU, Arteaga CL, et al. (2003). Second international conference on recent advances and future directions in endocrine manipulation of breast cancer: summary consensus statement. *Clin Cancer Res*. 9: 443-6

Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, et al. (1999a) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286: 2328-31

Couse JF, Korach KS. (1999). Reproductive phenotypes in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Ann Endocrinol*. 60: 143-8

Cowley SM, Parker MG. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69: 165-75

Cui Y, Zhang M, Pestell R. (2004). Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res*. 64: 9199-208

Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS. (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 12626-30

Damiani S, Eusebi V, Losi L, D'Adda T, Rosai J. (1998). Oncocytic carcinoma (malignant oncocytoma) of the breast. *Am J Surg Pathol*. 22: 221-30.

Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, Bradbury J, Clarke M, Collins R, Davis SR, Delmestri A, Forbes JF, Haddad P, Hou MF, Inbar M, Khaled H, Kielanowska J, Kwan WH, Mathew BS, Mittra I, Müller B, Nicolucci A, Peralta O, Pernas F, Petruzelka L, Pienkowski T, Radhika R, Rajan B, Rubach MT, Tort S, Urrútia G, Valentini M, Wang Y, Peto R; Adjuvant Tamoxifen: Longer Against Shorter (ATLAS) Collaborative Group. (2013) Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet*. 381: 805-16.

De la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci* 24: 192–198.

Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. (2000). Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem*. 275: 35848-56.

Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Ngankeu A, Taccioli C, Briskin D, Cheung DG, Bolon B, Anderlucci L, Alder H, Nuovo G, Li M, Iorio MV, Galasso M, Santhanam R, Marcucci G, Perrotti D, Powell KA, Bratasz A, Garofalo M, Nephew KP, Croce CM. (2013). Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. *PLoS Genet*. 9

Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. (1998). Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*. 273: 29321-30

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative group. (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for survival: an overview of the randomized trials. *Lancet* 365: 1687-1717

Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. (2006). Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer inst*. 98: 1406-1415

El-Tanani MK, Green CD. (1997). Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol*. 11: 928-37

Elston CW, Ellis IO. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 19: 403-410

Emens LA. (2005). Trastuzumab: targeted therapy for the management of HER-2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Am J ther*. 12: 243-53

Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoffman-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Muti P, Overvad K, Peeters PH, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS, Vineis P. (2013). Sex

hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* 14: 1009-19

Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K et al. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 4258–4265

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet.* 351: 1451–67.

Epstein M, Ma Y, Press MF. (2010). ERBB2 testing : assesment of status for targeted therapies. In: *Diseases of the breast, 4<sup>th</sup> edition*; Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. Wolters Kluwer Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia: pp 431-442

Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP. (1996). Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol.* 10: 1605-16.

Fatokun AA, Stone TW, Smith RA. (2007). Cell death in rat cerebellar granule neurons induced by hydrogen peroxide *in vitro*: mechanisms and protection by adenosine receptor ligands *Brain Res.* 1132: 193-202

Faye A, Poyet JL. (2010). Targeting AAC-11 in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 1: 57-65

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM, eds. *GLOBOCAN. (2008) v1.2 Cancer incidence and mortality world wide : IARC CancerBase 10 (internet)*. Lyon, France: International agency for research on cancer (<http://globocan.iarc.fr>)

Fellenberg J, Saehr H, Lehner B, Depeweg D. (2012). A microRNA signature differentiates between giant cell tumor derived neoplastic stromal cells and mesenchymal stem cells. *Cancer Lett.* 321: 162-8

Fischle W, Wang Y, Allis CD. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15: 172-83

Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO.* 19: 4688-700

Font de Mora J, Brown M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol.* 20: 5041-7

Forozan F, Veldman R, Ammerman CA, Parsa NZ, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Ethier SP. (1999). Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 81: 1328-1334

Förster C, Mäkela S, Wärrä A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA. (2002). Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 15578–15583

Fryer CJ, Archer TK. (1998). Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. *Nature*. 393: 88-91

Fu XD, Goglia L, Sanchez AM, Flamini M, Giretti MS, Tosi V, Genazzani AR, Simoncini T. (2010). Progesterone receptor enhances breast cancer cell motility and invasion via extranuclear activation of focal adhesion kinase. *Endocr Relat Cancer*. 17: 431-43

Fuqua SA, Fitzgerald SD, Allred DC, Elledge RM, Nawaz Z, McDonnell DP, O'Malley BW, Greene GL, McGuire WL. (1992). Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res*. 52: 483–486

Garcia-Jove Navarro M. (2011). l'inhibiteur d'apoptose Api5 et le facteur de transcription E2F1 : les liaisons dangereuses?. Thèse, Doctorat de l'Université de Toulouse III-Paul Sabatier.

Garcia-Jove Navarro M, Basset C, Arcondéguy T, Touriol C, Perez G, Prats H, Lacazette E. (2013). Api5 Contributes to E2F1 Control of the G1/S Cell Cycle Phase Transition. *PLoS One*. 8(8)

Garmy-Susini B, Delmas E, Gourdy P, Zhou M, Bossard C, Bugler B, Bayard F, Krust A, Prats AC, Doetschman T, Prats H, Arnal JF. (2004). Role of fibroblast growth factor-2 isoforms in the effect of estradiol on endothelial cell migration and proliferation. *Circ Res*. 94: 1301-1309

Gaub MP, Bellard M, Scheuer I, Chambon P, Sassone-Corsi P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*. 63: 1267-76

Gauci S, Helbig AO, Slijper M, Krijgsveld J, Heck AJ, Mohammed S. (2009). Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem*. 81: 4493-4501

Gianfrancesco F, Esposito T, Ciccodicola A, D'Esposito M, Mazzarella R, D'Urso M, Forabosco A (1999). Molecular cloning and fine mapping of API5L1, a novel human gene strongly related to an antiapoptotic gene. *Cytogenet Cell Genet*. 84: 164-166

Gilks CB, Clement PB. Ovary, *Histology for pathologists*, Stacey E Mills, 4eme ed, 2012: 1119-1149

Gong EY, Park E, Lee K. (2010). Hakai acts as a coregulator of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Sci*. 101: 2019-25

Gonzalez L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I. (2009) Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene*. 28: 1298-308

Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. (2005). Estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtype expression and transactivation capacity are differentially

affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 94: 71–81

Green S, Walter P, Kumar V et al. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence. *Nature.* 320: 134–139

Gronemeyer H. (1991). Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet.* 25: 89-123

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. (2002). Production and actions of estrogens. *N Engl J Med.* 346: 340-52

Gu G, Barone I, Gelsomino L, Giordano C, Bonofiglio D, Statti G, Menichini F, Catalano S, Andò S. (2012). Oldenlandia diffusa extracts exert antiproliferative and apoptotic effects on human breast cancer cells through ER $\alpha$ /Sp1-mediated p53 activation. *J Cell Physiol.* 227: 3363-72

Hall JM, McDonnell DP. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 140: 5566–5578

Hall JM, Couse JF, Korach KS. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 276: 36869-72

Hall JM, McDonnell DP. (2005). Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv.* 5 : 343-57

Hammes SR, Levin ER. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev.* 28: 726-41.

Han BG, Kim KH, Lee SJ, Jeong KC, Cho JW, Noh KH, Kim TW, Kim SJ, Yoon HJ, Suh SW, Lee S, Lee BI. (2012). Helical repeat structure of apoptosis inhibitor 5 reveals protein-protein interaction modules. *J Biol Chem.* 287: 10727-37

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell.* 98: 859-869

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 17: 1474-81

Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature.* 387: 733-736

Heery DM, Hoare S, Hussain S, Parker MG, Sheppard H. (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem.* 276 : 6695-702



Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. (2002). Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* 13: 55-60

Heldring N, Pawson T, McDonnell D, Treuter E, Gustafsson JA, Pike AC. (2007 a). Structural insights into corepressor recognition by antagonist-bound estrogen receptors. *J Biol Chem.* 282: 10449-55

Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. (2007 b). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 87: 905-31

Hiroi H, Inoue S, Watanabe T et al. (1999). Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus *J Mol Endocrinol.* 22: 37-44

Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu CR, Liu Ch CH, Azen SP; Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group. (2001). Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 135 : 939-53

Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature.* 377: 397-404

IARC , International Agency for research on Cancer (2002). Weight control and physical activity. IARC handbooks of cancer Prevention, Volume 6. IARC Press: Lyon

Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4658-62.

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. (1997). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol.* 11: 693-705

Janka M, Fischer U, Tonn JC, Kerkau S, Roosen K, Meese E. (1996). Comparative amplification analysis of human glioma tissue and glioma derived fragment spheroids using reverse chromosome painting (RCP). *Anticancer Res.* 16: 2601-2606

Jansen MP, Foekens JA, van Staveren IL, Dirkzwager-Kiel MM, Ritstier K, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Sieuwerts AM, Portengen H, Dorssers LC, Klijn JG, Berns EM. (2005). Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol.* 23: 732-740

Jensen EV. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med.* 6: 47-54

Johnson KC, Miller AB, Collishaw NE, Palmer JR, Hammond SK, Salmon AG, Cantor KP, Miller MD, Boyd NF, Millar J, Turcotte F. (2009). Active smoking and secondhand smoke

increase breast cancer risk: the report of the Canadian Expert Panel on Tobacco Smoke and Breast Cancer Risk. *Tob Control* 20

Jordan VC, O'Malley BW. (2007). Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* 25: 5815–5824

Joshi PA, Di Grappa MA, Khokha R. (2012). Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammaryogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23: 299-309

Kabat GC, Cross AJ, Park Y, Schatzkin A, Hollenbeck AR, Rohan TE, Sinha R. (2009). Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Int J Cancer.* 124: 2430-5

Kalaitzidis D, Gilmore TD. (2005). Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol. Metab* 16: 46–52

Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell.* 85: 403-14

Kang YK, Guermah M, Yuan CX, Roeder RG. (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 2642–7

Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270: 1491-4

Kato S. (2001). Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer.* 8: 3-9

Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. (2002). Biomedicine. Defining the "S" in SERMs. *Science.* 295: 2380-1

Khan SA, Rogers MA, Khurana KK, Meguid MM, Numann PJ. (1998). Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 90: 37–42.

Kim J, Park UH, Moon M, Um SJ, Kim EJ. (2013). Negative regulation of ER $\alpha$  by a novel protein CAC1 through association with histone demethylase LSD1. *FEBS Lett.* 587: 17-22

Kim JW, Cho HS, Kim JH, Hur SY, Kim TE, Lee JM, Kim IK, Namkoong SE (2000) AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest.* 80: 587-594

Kim Y, Bjorklund J.S, Li Y, Sayre M.H, and Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its targeted by phosphorimaging. interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77: 599–608

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell*. 46: 1053-61

Koci L, Chlebova K, Hyzdalova M, Hofmanova J, Jira M, Kysela P, Kozubik A, KalaZ, Krejci P. (2012) Apoptosis inhibitor 5 (API-5; AAC-11; FIF) is upregulated in human carcinomas in vivo. *Oncol Lett*. 3: 913-916

Koh SS, Chen D, Lee YH, Stallcup MR. (2001). Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities. *J Biol Chem*. 276: 1089-98

Korach KS. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*. 266: 1524-7

Koos RD. (2011). Minireview: Putting physiology back into estrogens' mechanism of action. *Endocrinology*. 152: 4481-827

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC. (2001). Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 104: 719-30

Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. (1994) .Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol*. 8: 952-69.

Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 15677-82

Krejci P, Pejchalova K, Rosenbloom BE, Rosenfelt FP, Tran EL, Laurell H, Wilcox W. (2007). The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2, are up-regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *J Leukoc Biol*. 82: 1363-1364

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93: 5925-5930

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K et al. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138: 863-870

Kumar V, Green S, Staub A, Chambon P. (1986). Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J*. 9: 2231-6.

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

Kumar V, Chambon P. (1988) .The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. 55: 145-56

- Kwon H, Imbalzano AN, Khavari PA, Kingston RE, Green MR. (1994). Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex. *Nature*. 370: 477-81
- Lacassagne A. (1936). Hormonal pathogenesis of adenocarcinoma of the breast. *Am J Cancer*. 2: 217–25
- Laherty CD, Billin AN, Lavinsky RM, Yochum GS, Bush AC, Sun JM, Mullen TM, Davie JR, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, Ayer DE, Eisenman RN. (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell*. 2: 33-42
- Lakhani, S.R., Ellis I.O., Schnitt, S.J, Tan, P.H, van de Vijier, M.J. (2012). WHO Classification of tumors, volume 4.
- Le Douarin B, vom Baur E, Zechel C, Heery D, Heine M, Vivat V, Gronemeyer H, Losson R, Chambon P. (1996). Ligand-dependent interaction of nuclear receptors with potential transcriptional intermediary factors (mediators). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351 : 569-78
- Lee HT, Gallos G, Nasr SH, Emala CW. (2004). A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol*. 15: 102-11
- Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. (1995). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature*. 374: 91-4
- Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell*. 31 : 212-21
- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. (2011). Cracking the estrogen receptor's post translational code in breast tumors. *Endocr Rev*. 32: 597-622
- Levin ER. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 20 : 477-82.
- Lewandowski S, Kalita K, Kaczmarek L. (2002). Estrogen receptor beta. Potential functional significance of a variety of mRNA isoforms. *FEBS Lett*. 524: 1–5
- Lewis-Wambi JS, Jordan VC. (2009). Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit? *Breast Cancer Res*. 11: 206
- Li X, Gao X, Wei Y, Deng L, Ouyang Y, Chen G, Zhang Q, Wu C. (2011). Rice APOPTOSIS INHIBITOR5 coupled with two DEAD-box adenosine 5'-triphosphate-dependent RNA helicases regulates tapetum degeneration. *Plant Cell*. 23: 1416-1434
- Limonta P, Montagnani Marelli M, Moretti RM. (2001). *Expert Opin Investig drug*. 10 :709-20.

- Lipponen P. (1999). Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer*. 6: 13-6.
- Liu S.(2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis.*Cancer Biol Ther*. 4: 1355-60
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse oestrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 11162-6
- MageePJ, Rowland IR. (2004). Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr*. 91: 513–531
- Malik S, Guermah M, Yuan CX, Wu W, Yamamura S, Roeder RG. (2004) Structural and functional organization of TRAP220, the TRAP/mediator subunit that is targeted by nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 24: 8244-54.
- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. (2002 ). Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 346: 2025-32
- MacGregor JI, Jordan VC. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*. 50: 151-96.
- Mallepell S, Krust A, Chambon P, Briskin C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103: 2196-201
- Manolagas SC. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 21: 115-37
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57: 385-409
- Maruti SS, Willett WC, Feskanich D, Rosner B, Colditz GA. (2008). A prospective study of agephysical activity and premenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 100: 728-737
- Marsden J, Backs NPM. (1996). Hormone replacement therapy and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 3: 81–97
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev*. 20: 321-44
- McKenna NJ, O'Malley BW. (2002). Combinatorial Control Review of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell*. 108: 465–474

McKian KP, Reynolds CA, Visscher DW, Nassar A, Radisky DC, Vierkant RA, Degenim AC, Boughey JC, Ghosh K, Anderson SS. (2009). Novel breast tissue feature strongly associated with risk of breast cancer. *J Clin Oncol.* 27: 5893–5898

Merrell KW, Crofts JD, Smith RL, Sin JH, Kmetzsch KE, Merrell A, Miguel RO, Candelaria NR and Lin C-Y. (2011). Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene.* 30: 1608–1614

Mills Stacey E. *Histology for pathologists 3<sup>eme</sup> ED.* Lippincott Williams et Wilkins 2007

Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, Liu S. (2005). RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 4: 1355-60

Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. (2004). Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast cancer risk among postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 96: 1856-1865

Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M, Spiegelman BM. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell.* 6: 307-16

Morris EJ, Michaud WA, Ji JY, Moon NS, Rocco JW, Dyson NJ. (2006). Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet.* 2: e196

Näär AM, Beurang PA, Zhou S, Abraham S, Solomon W, Tjian R. (1999). Composite coactivator ARC mediates chromatin-directed transcriptional activation. *Nature.* 398: 828-32

Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, Schreiber SL, Evans RM. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell.* 89: 373-80

Neil J. McKenna and Bert W. O'Malley. (2010). SnapShot : NR Coregulators. *Cell* 143

Norris JD, Fan D, Sherk A, McDonnell DP. (2002). A negative coregulator for the human ER. *Mol Endocrinol.* 16: 459-68

Nichols M, Rientjes JM, Stewart. (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J.* 17: 765-73

Obr AE, Edwards DP. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer *Mol Cell Endocrinol.* 357: 4-17

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T et al. (1998). The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 243: 122–126

- Ogawa S, Chester AE, Hewitt SC, et al. From the cover: abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). (2000). *Proc Natl Acad Sci USA*. 97: 14737–41
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. 18: 1859-75
- Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, Mann M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648
- Osborne CK. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*. 51: 227–38.
- Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 9: 1–13.
- Pazin MJ, Kadonaga JT. (1997 a). SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? *Cell*. 88: 737-40.
- Pazin MJ, Kadonaga JT. (1997 b). What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell*. 89: 325-8.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson JÄ, Kushner PJ, Scanlan TS. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$  at AP1 sites. *Science*. 277: 1508–1510
- Pearce ST, Jordan VC . (2004). The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 50: 3–22
- Pekow JR, Dougherty U, Mustafi R, Zhu H, Kocherginsky M, Rubin DT, Hanauer SB, Hart J, Chang EB, Fichera A, Joseph LJ, Bissonnette M. (2012). miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes. *Inflamm Bowel Dis*. 18: 94-100
- Peng C, Knebel A, Morrice NA, Li X, Barringer K, Li J, Jakes S, Werneburg B, Wang L. (2007). Pim kinase substrate identification and specificity. *J Biochem*. 141: 353-362
- Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Metivier R, Flouriot G. (2005). The human estrogen receptor- $\alpha$  isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 146: 5474–5484
- Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev*. 13: 3198-208
- Peterson CL. (2002a). Chromatin remodeling enzymes: taming the machines. Third in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*. 3 : 319-22

Peterson CL. (2002b). Chromatin remodeling: nucleosomes bulging at the seams. *EMBO Rep.* 12: 245-7

Pierce LJ. (2005). The use of radiotherapy after mastectomy: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 23: 1706-17

Planas-Silva MD, Waltz PK, Kilker RL, Berry M, Metzger D, Chambon P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9: 2811-8

Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. (1998). Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer.* 75: 750-6

Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, Garcia M. (2004). Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* 51: 55-67.

Plevin MJ, Mills MM, Ikura M. (2005). The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 30: 66-69

Poola I, Koduri S, Chatra S, Clarke R. (2000). Identification of twenty alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs in breast cancer cell lines and tumors using splice targeted primer approach. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 72: 249-258

Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol.* 11: 1569-80

Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Le Romancer M. (2010) Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors *Med Sci. (Paris)* 26: 636-40

Price JE. (1990a). The biology of metastatic breast cancer. *Cancer.* 66: 1313-20

Price JE, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM. (1990b). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.* 50: 717-21

Rachez C, Lemon BD, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Näär AM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature.* 398: 824-8.

Razandi M, Pedram A, Levin ER. (2000). Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 14: 1434-47

Renehan AG, Harvie M, Howell A. (2006). Insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein-3, and breast cancer risk : eight years on. *Endocr Relat Cancer.* 13: 273-278

Renoir JM. (2012). Estradiol receptors in breast cancer cells: associated co-factors as targets for new therapeutic approaches. *Steroids.* 77: 1249-61



Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. (1998) .The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta*. 1378: F61-77

Rieber J, Remke M, Hartmann C, Korshunov A, Burkhardt B, Sturm D, Mechttersheimer G, Wittmann A, Greil J, Blattmann C, Witt O, Behnisch W, Halatsch ME, Orakcioglu B, von Deimling A, Lichter P, Kulozik A, Pfister S. (2009). Novel oncogene amplifications in tumors from a family with Li-Fraumeni syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. 48: 558-568

Rigou P, Piddubnyak V, Faye A, Rain JC, Michel L, Calvo F, Poyet JL. (2009). The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J*. 28: 1576-1588

Robertson JF, Osborne CK, Howell A, et al. (2003). Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma in postmenopausal women: a prospective combined analysis of two multicenter trials. *Cancer*. 98: 229–38.

Rocak S, and Linder P. (2004). DEAD-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 5: 232–241

Rocheffort H, Platet N, Hayashido Y, Derocq D, Lucas A, Cunat S, Garcia M. (1998). Estrogen receptor mediated inhibition of cancer cell invasion and motility: an overview. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 65: 163-8

Roddy HJ, Silverberg SG. (1980). Ultrastructural analysis of apocrine carcinoma of the human breast. *Ultrastruct Pathol*. 1: 385-93.

Roger P, Daures JP, Maudelonde T, et al. (2000). Dissociated overexpression of cathepsin-D and estrogen receptor  $\alpha$  in preinvasive mammary tumors. *Hum Pathol*. 31: 593–600.

Roger P, Esslimani Sahla M, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rocheffort H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor  $\beta$  protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res*. 61: 2537–41.

Safe S. (2001) . Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm*. 62: 231-52

Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature*. 401: 168–173

Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M, Toi M. (2005). Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. 24: 4531-9.

Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JÄ, Safe S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype ( $\alpha/\beta$ )-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J. Biol. Chem*. 275: 5379–5387

- Santen RJ. (2003). Inhibition of aromatase: insights from recent studies. *Steroids*. 68: 559–67.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 419: 407-11
- Sasaki H, Moriyama S, Yukiue H, Kobayashi Y, Nakashima Y. (2001). Expression of the antiapoptosis gene, AAC-11, as a prognosis marker in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer*. 34: 53–57.
- Sauvé K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A. (2009) Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res*. 69: 5793-800.
- Savkur RS, Burris TP. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res*. 63: 207-12
- Schiff R, Osborne CK, Fuqua SAW. (2010). Clinical aspect of oestrogen and progesterone receptors; In *Diseases of the breast*, 4<sup>th</sup> edition. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osbourne CK, eds. Wolters Kluwer lipincott Williamsand Wilkins: Phidadelphia: pp 408-430
- Sisci D, Aquila S, Middea E, Gentile M, Maggiolini M, Mastroianni F, Montanaro D, Andò S. (2004). Fibronectin and type IV collagen activate ERalpha AF-1 by c-Src pathway: effect on breast cancer cell motility. *Oncogene*. 23: 8920-30.
- Scisciani C, Vossio S, Guerrieri F, Schinzari V, De Iaco R, D'Onorio de Meo P, Cervello M, Montalto G, Pollicino T, Raimondo G, Levrero M, Pediconi N. (2012). Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NFκB inflammatory pathways. *J Hepatol*. 56: 855-61
- Schwartz GF. (2001). Consensus conference on the classification of ductal carcinoma in situ: the current treatment of ductal carcinoma in situ. *Breast J*:308–10
- Seoud MA, Johnson J, Weed JC Jr. (1993) .Gynecologic tumors in tamoxifen-treated women with breast cancer. *Obstet Gynecol*. 82: 165-9
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*. 103 : 843-52
- Shang Y, Brown M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 295: 2465-8
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*. 95: 927-37
- Shim, GJ., Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, Makela, S, Warner M, Gustafsson JA. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 100: 6694–6699

- Singh M, Sétáló G Jr, Guan X, Frail DE, Toran-Allerand CD. (2000). Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci.* 20: 1694-700.
- Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. (2006). Expression of oestrogen receptor- $\beta$  in oestrogen receptor- $\alpha$  negative human breast tumours. *Br J Cancer.* 95: 616-626
- Smith CL. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod.* 58: 627-32
- Smith CL, O'Malley BW. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selectivereceptor modulators. *Endocr Rev.* 25: 45-71
- Sohn YC, Kim SW, Lee S, Kong YY, Na DS, Lee SK, Lee JW. (2003). Dynamic inhibition of nuclear receptor activation by corepressor binding. *Mol Endocrinol.* 17: 366-72
- Strasser-Weippl K and Goss PE. (2005). Advances in adjuvant hormonal therapy for postmenopausal women. *J Clin Oncol.* 23: 1751-9.
- Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, Rennert OM, Su YA. (2009). Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. *Mol Cancer Ther.* 8: 1292-1304
- Su X, Harkinson SE, Clevenger CV, Eliassen AH, Trower SS. (2009). Energy balance, early life body size, and plasma prolactin levels in postmenopausal women. *Cancer Causes Control.* 20: 253-262
- Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P. (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell.* 30: 336-47
- Taatjes DJ. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci.* 35: 315-22
- Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science.* 272: 408-11
- Taylor AH, Al-Azzawi F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol.* 24: 145-155
- Tewari M, Yu M, Ross B, Dean C, Giordano A, Rubin R. (1997). AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer Res.* 57: 4063-4069
- Thompson EW, Reich R, Shima TB, Albini A, Graf J, Martin GR, Dickson RB, Lippman ME. (1988). Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens. *Cancer Res.* 48: 6764-8.

- Thompson EW, Paik S, Br nner N. (1992). Association of increased basement membrane-invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol.* 150: 534–44
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell.* 59: 477-87
- Torchia J, Rose D. W, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK, and Rosenfeld MG. (1997). *Nature.* 387: 677–684
- Treeck O, Latr ch C, Springwald A, Ortmann O. (2010). Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat.* 120: 557-65
- Treuter E, Albrektsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. (1998). A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol.* 12: 864-81
- Tryggvason K, H yhty M, Pyke C. (1993) .Type IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 24: 209-18. Review
- Tu D, Li W, Ye Y, Brunger A. T. (2007). Structure and function of the yeast U-box-containing ubiquitin ligase Ufd2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104: 15599–15606
- TwoRoger SS, Hankinson SE. (2008). Prolactin and Breast cancer etiology: an epidemiologic perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 13: 41-53
- Ursing G, Longnecker MP, Haile, P, Greenland S. (1995). A meta-analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer. *Epidemiology.* 6: 137-141
- Van den Berghe L, Laurell H, Huez I, Zanibellato C, Prats H, Bugler B. (2000). FIF [fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-interacting-factor], a nuclear putatively antiapoptotic factor, interacts specifically with FGF-2. *Mol Endocrinol.* 14: 1709-1724
- Wakeling AE, Bowler J. (1992). ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:173–7
- Varghese JS, Easton DF. (2010). Genome –wide association studies in common cancers-what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev.* 20: 201-209
- Varlakhanova N, Snyder C, Jose S, Hahm JB, Privalsky ML. (2010). Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol Cell Biol* 30 : 1434-45
- Villadsen R. (2005) In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution. *APMIS* 113: 903-21
- Villadsen R, Fridriksdottir AJ, R nnov-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBarge MA, Bissell MJ, Petersen OW. (2007). Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol.* 177: 87-101

- Vousden KH, Prives C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 137: 413-31
- Wiesen JF, Young P, Werb Z, Cunha GR. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development*. 126: 335–344
- Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson JA. (2008). A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor  $\beta$  on estrogen receptor  $\alpha$  signaling in breast cancer cells. *Oncogene*. 27: 1019–1032
- Wang C, Fu M, Angeletti RH. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem*. 276: 18375-83.
- Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. (2002). P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J*. 21: 5437-47
- Wang Y, Lee AT, Ma JZ, Wang J, Ren J, Yang Y, Tantoso E, Li KB, Ooi LL, Tan P, Lee CG. (2008). Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target. *J Biol Chem*. 283: 13205-15
- Webb P, Nguyen P, Shinsako J, Anderson C, Feng W, Nguyen MP, Chen D, Huang SM, Subramanian S, McKinerney E, Katzenellenbogen BS, Stallcup MR, Kushner PJ. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol*. 12: 1605-18
- Webb P, Nguyen P, Valentine C, Lopez GN, Kwok GR, McInerney E, Katzenellenbogen BS, Enmark E, Gustafsson JÄ, Nilsson S, Kushner PJ. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*. 13: 1672–1685
- Weitsman GE, Li L, Skliris GP. (2006). Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res*. 66: 10162-70.
- Welling SR, Jensen HM, Marcum RG. (1975). An atlas of subgross pathology of the Human Breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst*. 55: 231-273.
- Windahl SH, Treuter E, Ford J, Zilliacus J, Gustafsson JA, McEwan IJ. (1999). The nuclear-receptor interacting protein (RIP) 140 binds to the human glucocorticoid receptor and modulates hormone-dependent transactivation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 71: 93-102
- White R, Leonardsson G, Rosewell I, Ann Jacobs M, Milligan S, Parker M. (2000). The nuclear receptor co-repressor nr1p (RIP140) is essential for female fertility. *Nat Med*. 6: 1368-74

Woodhouse EC, Amanatullah DF, Schetz JA, Liotta LA, Stracke ML, Clair T. (1998). Adenosine receptor mediates motility in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 246: 888-94

Wu C. (1997). Chromatin remodeling and the control of gene expression. *J Biol Chem.* 272: 28171-4

Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. (2006). Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci.* 11: 344-55

Xiang F, Huang YS, Zhang DX, Chu ZG, Zhang JP, Zhang Q. (2010). Adenosine A1 receptor activation reduces opening of mitochondrial permeability transition pores in hypoxic cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 37: 343-9

Xiaohong R. Yang, Jonine D. Figueroa, Stephen M. Hewitt, Roni T. Falk, Ruth M. Pfeiffer, Jolanta Lissowska, Beata Peplonska, Louise A. Brinton, Montserrat Garcia-Closas, Mark E. Sherman. (2013). Estrogen receptor and progesterone receptor expression in normal terminal duct lobular units surrounding invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 137 : 837–847

Yang X. J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: A new partnership for signaling. *Bioessays.* 26: 1076–1087

Yeretssian G, Doiron K, Shao W, Leavitt BR, Hayden MR, Nicholson DW, Saleh M. (2009). Gender differences in expression of the human caspase-12 long variant determines susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 9016-20

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* 11: 3681-94.

Zang SM, Willett WC, Selhub J, Hankinson SE. (2003). Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, homocysteine, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 95: 373-380.

Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E. (2000). DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem.* 275: 39855-9.

Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol.* 12: 513–524

Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY. (2011). A positive feedback loop of ER- $\alpha$  36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene.* 30: 770–780

Zwart W, Griekspoor A, Berno V. (2007). PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ER $\alpha$  towards co-activator SRC-1. *EMBO J.* 26: 3534-44

Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, ManciniMA, MichalidesR. (2010). The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci.* 123: 1253–1261