



**HAL**  
open science

# Dialogue entre le recepteur des oestrogènes alpha et le facteur de croissance IGF-I dans l'activation transcriptionnelle des cellules cancéreuses mammaires

Sylvain Pierre, Raoul, Vincent Baron

► **To cite this version:**

Sylvain Pierre, Raoul, Vincent Baron. Dialogue entre le recepteur des oestrogènes alpha et le facteur de croissance IGF-I dans l'activation transcriptionnelle des cellules cancéreuses mammaires. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2007. Français. NNT : . tel-00155908

**HAL Id: tel-00155908**

**<https://theses.hal.science/tel-00155908v1>**

Submitted on 19 Jun 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année universitaire 2006-2007

**UNIVERSITE TOULOUSE III - PAUL SABATIER**  
**UFR SCIENCES DE LA VIE**

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III**

*Discipline : Biologie-Santé-Biotechnologies*

Présentée par **Sylvain BARON**

DIALOGUE ENTRE LE RECEPTEUR DES OESTROGENES  $\alpha$  ET LE  
FACTEUR DE CROISSANCE IGF-I DANS L'ACTIVATION  
TRANSCRIPTIONNELLE DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES

Soutenue le jeudi 24 mai 2007 à 14H30

Salle de conférence de l'IEFG, Bâtiment IBCG,  
118 route de Narbonne, 31062 CEDEX 09

**JURY**

**Pr. Bernard DUCOMMUN : Président du jury**

**Dr. Gilles Freiss : Rapporteur**

**Dr. Jack-Michel RENOIR : Rapporteur**

**Dr. Hélène RICHARD-FOY : Directeur de thèse**



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Bernard Ducommun pour avoir accepté d'être président du jury, Michel Renoir et Gilles Freiss, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et pour leurs remarques très constructives.

Je remercie Hélène pour m'avoir accueilli dans son équipe voilà six ans maintenant. Merci pour ton encadrement et pour avoir été présente quand il le fallait et cela malgré tous les coups durs.

Merci à tous les membres de l'équipe HRF, passés et présents, avec qui j'ai partagé un bout de paillasse, des discussions scientifiques ou non ainsi que beaucoup de rigolades et de délires. Dans le désordre merci à Silvia, Anne Claire, Mathilde, Clarisse, Matha, Natalia, mes p'tites stagiaires Géraldine et Aurélie, Lola, Marie, Elodie, Stefano, Isa.

Un grand merci à Lolotte pour tous les bons moments passés à l'intérieur et à l'extérieur du labo. Et notamment pour cette ambiance 'colo' qui pouvait parfois régner dans l'équipe et pour ton soutien sans faille.

Un grand merci aux amis que j'ai pu me faire au cours de ces années : Yom, Nico, Patou, Lolotte, Jue, brichon, béa, R1 et Sarah, Simon, Tof, élé, olive et julie, coco, isa...et tous les autres! Merci pour les barbeuks/randos/gouaille/week end ski/risks/soirées alphaT/louchebem...Tout ce qui a rendu ma vie toulousaine passionnante.

Merci à tous les membres du LBME et en particulier aux petites mains sans qui tout cela ne marcherait pas : merci à Cathy et Safi, nos secrétaires de choc, aux gars de l'atelier, à Chantal et à David notre photographe, spécialisé dans l'impression de posters (pas forcément scientifiques) et le consulting dans le choix du meilleur numérique à offrir (cadeau phare des soutenances de thèse).



Merci aussi aux personnes qui ont contribué à mes travaux de thèse :

- nos collaborateurs de Montpellier, en particulier Patrick Balaguer et Aurélie Escande, qui ont eu la générosité de nous fournir de nombreuses lignées cellulaires développées par leur soin.

- Françoise, qui a eu la gentillesse et la patience de passer des journées entières en salle de culture pour développer des lignées stables pour moi.

Je remercies aussi les organismes qui m'ont financé : la Ligue Nationale Contre le Cancer et la Fondation pour la Recherche Médicale.

Et enfin je tiens à remercier ma famille, pour tout.

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**AF 1/2**: Activation Function 1/2  
**AP1**: Activator Protein 1  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ASC 1/2**: Activating Signal Cointegrator  
**ATF**: Activating Transcription Factor  
**ATP**: Adénosine Tri-Phosphate  
**CARM1**: Co-activator Associated Arginine Méthyl Transferase 1  
**CBP**: CREB Binding Protein  
**Cdk**: Cyclin dependant kinase  
**CK**: Casein Kinase  
**DBD**: DNA Binding Domain  
**E2**: oestradiol  
**EGF**: Epidermal Growth Factor  
**EMT**: Epithelial Mesenchymal Transition  
**ERAP 160**: Estrogen Receptor Associated Protein 160  
**ERK**: Extracellular Regulated Kinase  
**FRK** : Fos Related Kinase  
**Grb10**: Growth factor receptor binding protein 10  
**GSK**: Glycogen Synthase Kinase  
**HAT**: Histone Acetyl Transferase  
**HB-EGF**: Heparin Binding EGF  
**HDAC**: Histone Deacetylase  
**hRPF1**: human Receptor Potentiating Factor 1  
**Hsp 90/70**: Heat shock protein 90/70  
**IGF-I/II**: Insulin like Growth Factor I/II  
**IGF-IR/IGF-IIR**: Récepteur à l'IGF de type I/II  
**IGFBP**: IGF Binding Protein  
**IKK**: IκB Kinase

**IRS:** Insulin Receptor Substrate  
**LBD:** Ligand Binding Domain  
**JNK:** Jun Kinase  
**MAF:** Musculo Aponeuretic Fibrosarcoma  
**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase  
**MMP:** Métalloprotéinase de la matrice  
**mTOR:** mammalian Target Of Rapamycin  
**N-Cor:** Nuclear Corepressor  
**OH-Tam:** 4 hydroxytamoxifen  
**PK1:** 3-phosphoinositide dependant protein kinase 1  
**PI3K:** Phosphatidyl inositol 3 Kinase  
**PKA:** Protein Kinase A  
**PIP3:** Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate  
**PRMT:** Protein Arginine Methyl Transferase 1  
**RE:** Récepteur des oestrogènes  
**REA:** Repressor of Estrogen Action  
**RIP 140/160:** Receptor interacting Protein 140/160  
**RSK:** Ribosomal protein S6 Kinase  
**SERM:** Selective Estrogen Receptor Modulator  
**SGK:** Serum and Glucocorticoid Kinase  
**Shc:** src-homology 2 / collagen alpha proteins  
**SMRT:** Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor  
**SOS:** Son Of Sevenless  
**SRA:** Steroid Receptor Activator  
**SRC 1/2/3:** Steroid Receptor Co-activator 1/2/3  
**STAT 3:** Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**TCF:** Ternary Complex Factor  
**TF-II 1:** Transcription Factor II 1  
**TIF1:** Transcription Intermediary Factor 1  
**TNF:** Tumor Necrosis Factor  
**Upa:** Urokinase Plasminogen system

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION....1

|   |           |
|---|-----------|
| <b>A/ La glande mammaire.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>B/ Le RE<math>\alpha</math> : structure, fonction et rôle physiologique.....</b>           | <b>4</b>  |
| 1/ Synthèse, structure et pharmacologie du RE.....  | 4         |
| a/ Découverte du RE.....  | 4         |
| b/ Structure du RE.....   | 4         |
| c/ Les gènes codant RE $\alpha$ et RE $\beta$ .....   | 7         |
| d/ Les ligands du RE.....   | 9         |
| <i>Les oestrogènes.....</i>   | 9         |
| <i>Les anti-oestrogènes.....</i>  | 9         |
| <i>Les phyto-oestrogènes.....</i>   | 10        |
| e/ Modèle d'étude : le gène oestrogéno-régulé pS2/TFF1.....                                   | 11        |
| 2/ Rôle biologique des REs.....   | 12        |
| a/ Expression tissulaire.....   | 12        |
| b/ Rôle dans l'appareil reproducteur.....   | 14        |
| c/ Rôle dans l'os.....  | 15        |
| d/ Rôle dans le système cardio-vasculaire.....  | 15        |
| e/ Rôle dans le cerveau.....  | 16        |
| <b>C/ Mécanismes moléculaires d'action du RE<math>\alpha</math> et leurs régulations.....</b> | <b>16</b> |
| 1/ Activation du RE $\alpha$ : du ligand à la liaison à l'ADN.....                            | 16        |
| a/ HSP90.....   | 16        |
| b/ Liaison du ligand.....   | 18        |
| c/ Changement de conformation.....  | 18        |
| d/ Dimérisation.....  | 18        |
| e/ Liaison du RE à l'ADN.....   | 19        |
| <i>Fixation directe à l'ADN : les EREs.....</i>   | 19        |
| <i>Le « docking » : interaction du RE avec un facteur liant l'ADN.....</i>                    | 20        |
| 2/ Les partenaires du RE $\alpha$ dans l'activation de la transcription.....                  | 20        |
| a/ Mise en évidence des facteurs modulant l'activité du RE $\alpha$ .....                     | 20        |
| b/ Identification des cofacteurs interagissant avec le domaine AF2 du RE $\alpha$ .....       | 21        |
| c/ Interaction entre RE $\alpha$ et p160.....   | 22        |
| d/ Les co-activateurs spécifiques du domaine AF1.....   | 23        |
| e/ Les co-activateurs indirects du RE $\alpha$ .....  | 24        |
| f/ Les co-répresseurs du RE $\alpha$ .....  | 24        |
| <i>Les co-répresseurs physiologiques.....</i>   | 24        |
| <i>Les co-répresseurs du RE<math>\alpha</math> complexé aux anti-oestrogènes.....</i>         | 25        |
| 3/ Impact des voies de signalisation sur l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$ .....   | 26        |
| a/ Les Sites de phosphorylation du RE $\alpha$ .....  | 26        |
| b/ Impact de la phosphorylation du RE $\alpha$ sur son activité transcriptionnelle.....       | 27        |
| c/ Impact des voies de signalisations sur les co-régulateurs du RE $\alpha$ .....             | 28        |
| d/ Les autres modifications post traductionnelles du RE $\alpha$ .....                        | 29        |
| <b>D/ La voie de signalisation IGF-I.....</b>   | <b>30</b> |
| 1/ Rôle physiologique et physiopathologique de l'IGF-I.....                                   | 30        |

|  |           |
|--|-----------|
| a/ L'IGF-I dans le développement normal de la glande mammaire.....                     | 30        |
| b/ Effets de l'IGF-I sur le reste de l'organisme.....                                  | 31        |
| c/ IGF-I et cancer du sein.....  | 31        |
| 2/ La cascade de signalisation IGF-I : du facteur de croissance au noyau.....          | 31        |
| a/ Du peptide a la membrane cytoplasmique.....   | 31        |
| <i>Les ligands IGF</i> .....   | 31        |
| <i>Expression de IGF-I et IGF-II</i> .....   | 32        |
| <i>Les récepteurs IGF</i> .....  | 33        |
| <i>Les IGFBPs</i> .....  | 33        |
| <i>Structure et Activation du IGF-RI</i> .....   | 34        |
| b/ De la membrane cytoplasmique au cytoplasme.....                                     | 35        |
| <i>La voie PI3 kinase/AKT</i> .....  | 36        |
| Survie cellulaire.....   | 37        |
| Prolifération.....   | 38        |
| Croissance cellulaire.....   | 39        |
| <i>La voie Ras</i> .....   | 39        |
| c/ Effets nucléaires de l'IGF-I.....   | 40        |
| <i>NF-κB</i> .....   | 41        |
| CREB.....  | 42        |
| ETS.....   | 43        |
| <i>c-Myc</i> .....   | 44        |
| 3/ Régulation de la voie IGF-I et connections avec les autres voies de signalisation.. | 47        |
| a/ Les protéines tyrosines phosphatases.....   | 47        |
| b/ Dialogue entre oestradiol et IGF-I.....   | 48        |
| c/ Connexions entre la voie IGF-I et d'autres voies de transduction de signal.         | 49        |
| <b>E/ Le complexe AP1.....</b>   | <b>50</b> |
| 1/Présentation générale du complexe.....   | 50        |
| a/ La famille des protéines AP1.....   | 50        |
| b/ Rôle du complexe AP1 dans le développement du cancer.....                           | 51        |
| c/ Antagonisme entre les différents composants du complexe AP1.....                    | 52        |
| 2/ Les fonctions spécifiques du complexe AP1.....                                      | 53        |
| a/ Dans la prolifération cellulaire.....   | 53        |
| b/ Dans la survie cellulaire.....  | 54        |
| c/ Dans l'angiogénèse.....   | 55        |
| 3/ La régulation de l'activité du complexe AP1.....                                    | 56        |
| a/ La composition des dimères.....   | 57        |
| b/ Les régulations transcriptionnelles et les modifications post-                      |           |
| traductionnelles.....  | 57        |
| c/ Les partenaires du complexe AP1 pour l'activation transcriptionnelle.....           | 59        |
| d/ Le REα et complexe AP1.....   | 59        |
| <b>F/ Objectif des travaux.....</b>  | <b>60</b> |

## RESULTATS....62

### **Partie I : Dialogue entre le récepteur des oestrogènes $\alpha$ et le facteur de croissance IGF-I dans l'activation transcriptionnelle des cellules cancéreuses mammaires.....62**

Publication: "Estrogen receptor and the AP1 complex cooperate during IGF-I- induced transcriptional activation of the pS2TFF1 gene".....64

### **Partie II : Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$ .....66**

Résultats.....68

1/ Construction et validation du vecteur HTF-RE.....68

a - Construction du vecteur HTF-RE .....68

b - Test de fonctionnalité de la protéine de fusion HTF-RE.....69

c - Etude des conditions d'expression de la protéine de fusion HTF-RE.....70

d - Reconnaissance des épitopes HA et FLAG en milieu non dénaturant.....71

e - Etude cinétique du clivage de la protéine de fusion HTF-RE par la TEV..71

2/ Développement et caractérisation des lignées stables.....72

a - Construction des lignées stables exprimant le HTF-RE.....72

b - Caractérisation des lignées cellulaires exprimant HTF-RE.....73

## DISCUSSION....77

**Le dialogue entre IGF-I et RE $\alpha$ .....77**

**Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$  : perspectives.....83**

1/ Bases moléculaires du fonctionnement des ligands du RE $\alpha$  .....83

2/Mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$  stimulé par le facteur de croissance IGF-I.....84

## CONCLUSION GENERALE....85

## ANNEXES....87

**A- Matériel et méthodes de la partie «Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$  ».....87**

I Matériel biologique.....87

1 - Lignées cellulaires.....87

2 - Plasmides .....87

3 - Oligonucléotides .....87

II Méthodes .....88

1 - culture cellulaire et traitement des cellules par l'hormone et l'antihormone.....88

2 - construction des vecteurs recombinants.....89

3 - Transfections transitoires.....90

4 - Mesures d'activités luciférases et  $\beta$  galactosidases.....90

5 - Western Blot .....91

6 - Immunoprécipitations.....92

7 - Digestion par la TEV .....92

8 - Dosage du RE $\alpha$  par la méthode de Scatchard.....93

**B- Participation à d'autres travaux de recherches.....94**

## BIBLIOGRAPHIE....111



## RESUME

Le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires est un phénomène complexe. Les oestrogènes jouent un rôle important dans le contrôle de cette prolifération. L'action des oestrogènes se fait via le récepteur des oestrogènes  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), un facteur de transcription qui complexé à l'oestradiol, est capable de moduler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose ou la différenciation cellulaire. L'utilisation d'anti-hormones qui sont des inhibiteurs compétitifs de l'oestradiol bloquent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires. Malheureusement les patientes métastatiques traitées par ce type de molécules développent systématiquement une résistance aux thérapies anti-hormonales. Les facteurs de croissance, tels que l'EGF ou l'IGF-I, qui entraînent une activation du RE $\alpha$  de manière ligand indépendante pourraient être responsable de l'apparition de ces phénomènes de résistance. L'étude des voies d'activation du RE $\alpha$  par ces facteurs de croissance est donc importante. Le facteur de croissance IGF-I participe au contrôle du développement de la glande mammaire pendant l'embryogenèse et il a une activité oestrogène dans les cellules cancéreuses mammaires. Cette activité oestrogène de l'IGF-I requiert l'expression du récepteur des oestrogènes  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), mais on ne connaît pas les mécanismes moléculaires mis en jeu. Nous avons démontré que sur un promoteur complexe tel que le promoteur du gène oestrogéno régulé pS2/TFF1, qui contient un site de liaison au RE $\alpha$  et un site de liaison au complexe AP1, l'activation transcriptionnelle de ce gène requiert le RE $\alpha$  et le complexe AP1. L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence un mécanisme d'action original et non conventionnel du RE $\alpha$ , en absence d'hormone. En présence du facteur de croissance IGF-I, le RE $\alpha$  est nécessaire mais pas suffisant pour activer la transcription et le complexe AP1 joue un rôle aussi important que le RE $\alpha$  dans l'activation transcriptionnelle du gène pS2/TFF1. Ce complexe AP1, ou les voies conduisant à son activation pourrait donc être des cibles thérapeutique de choix pour le traitement du cancer du sein.

**MOTS-CLES** : récepteur des oestrogènes, IGF-I, cancer du sein, pS2/TFF1, complexe AP1.

## ABSTRACT

Insulin like growth factor I (IGF-I) displays estrogenic activity in breast cancer cells. This activity is strictly dependent on the presence of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). However the precise molecular mechanisms involved in this process are still unclear. IGF-I treatment induces phosphorylation of the AF1 domain of ER $\alpha$  and activation of estrogen regulated genes. These genes are characterized by important differences in promoter architecture and response element composition. We show that promoter structure is crucial for IGF-I induced transcription activation. We demonstrate that on a complex promoter such as the pS2/TFF1 promoter, which contains binding sites for ER $\alpha$  and for the AP1 complex, transcriptional activation by IGF-I requires both ER $\alpha$  and the AP1 complex. IGF-I is unable to stimulate transcription of an estrogen-regulated gene under the control of a minimal promoter containing only a binding site for ER $\alpha$ . We propose a molecular mechanism with stepwise assembly of the AP1 complex and ER $\alpha$  during transcription activation of pS2/TFF1 by IGF-I. IGF-I stimulation induces rapid phosphorylation and an increase in protein levels of the AP1 complex. Binding of the phosphorylated AP1 complex to the pS2/TFF1 promoter allows recruitment of the chromatin remodeling factor Brg1 followed by binding of ER $\alpha$ , via its interaction with c-Jun.

**KEY-WORDS**: estrogen receptor, IGF-I, breast cancer, pS2/TFF1, AP1 complex



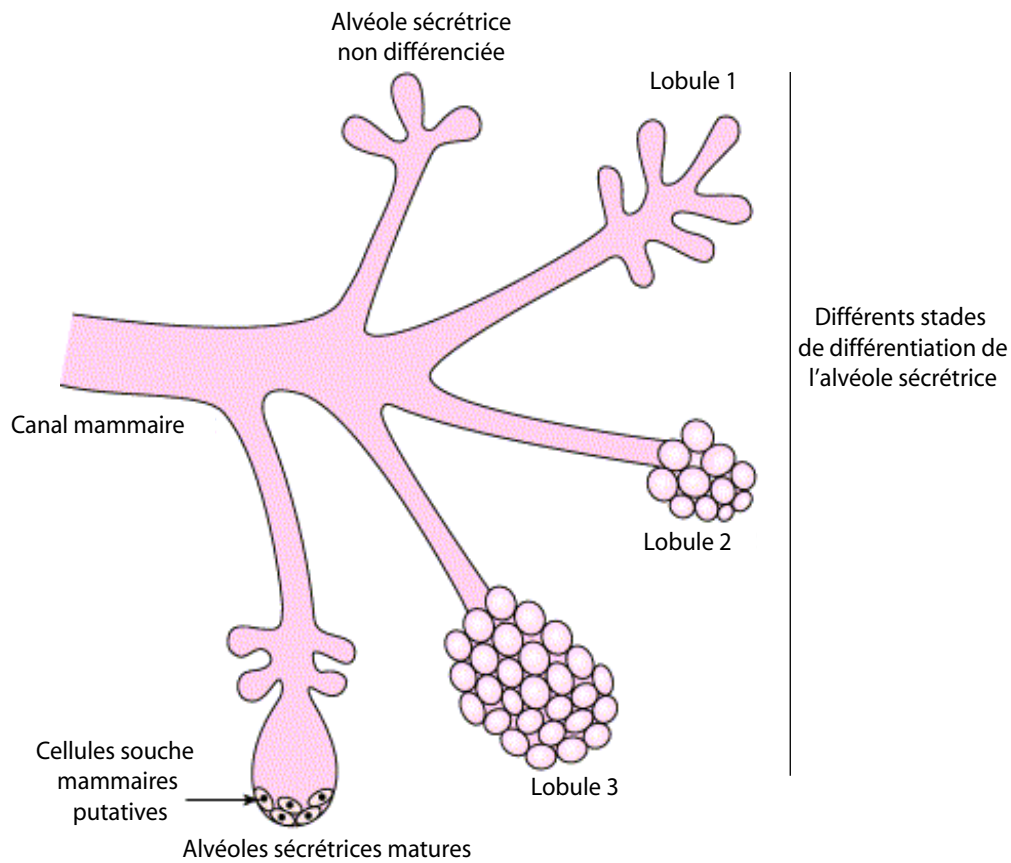
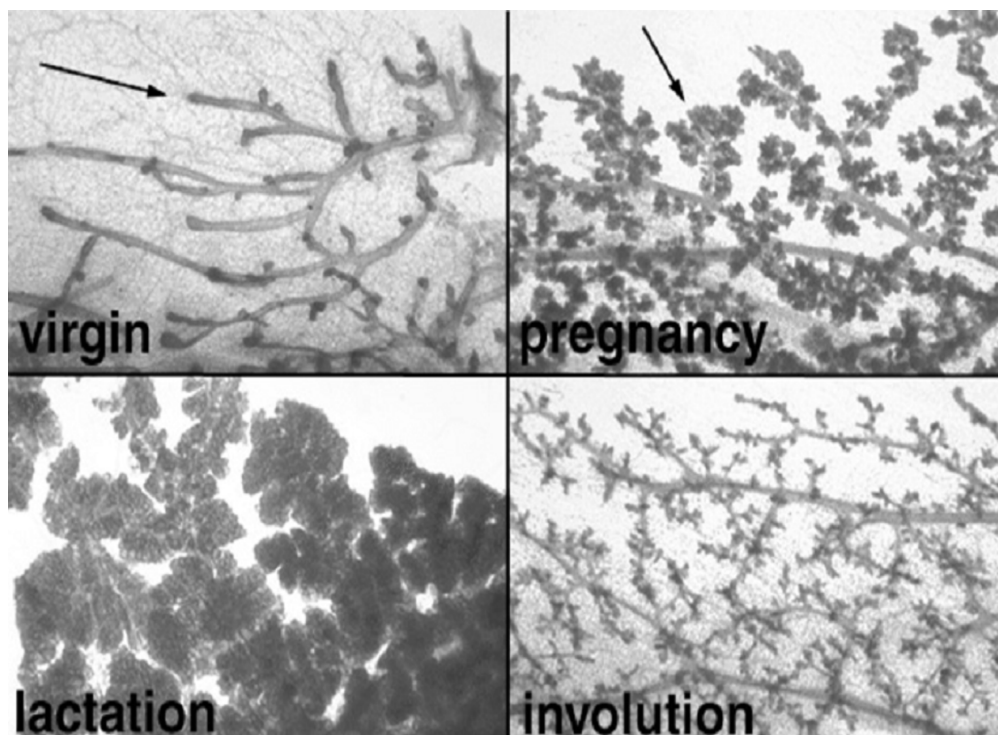
**A****B**

Figure 1: A/ Les différents stades du développement de la glande mammaire - Entre la naissance et la puberté il y a peu de changements dans le système canalaire immature. Durant la puberté, l'augmentation en taux d'oestrogènes, d'hormones de croissance et d'IGF-I provoque la prolifération de l'épithélium mammaire qui se développe en plusieurs canaux (lobule 1). Cette prolifération continue donne naissance à une alvéole (lobule 2). Pendant la grossesse le taux élevé d'oestrogènes et de progestérone stimule la prolifération épithéliale des cellules de l'alvéole et cela entraîne la formation d'environ 80 lobules au niveau de l'alvéole. Ces cellules alvéolaires complètement différenciées sont maintenant capables de produire du lait. B/ Etude en microscopie des différents stades de développement de la glande mammaire de souris. Les flèches indiquent les alvéoles sécrétrices.

# INTRODUCTION

## **A/ La glande mammaire**

Sur l'échelle du temps de l'apparition des organes, la glande mammaire est une acquisition récente. Cet organe est apparu il y a 200 millions d'années avec le besoin pour les mammifères de nourrir leur progéniture.

Le tissu épithélial de la glande mammaire est un organe qui est composé de deux types cellulaires. Les premières sont les cellules épithéliales luminales qui délimitent la lumière des alvéoles sécrétrices et produisent les protéines contenues dans le lait maternel. Les secondes sont les cellules myoépithéliales qui sont des cellules musculaires autonomes capables de se contracter en réponses aux sollicitations hormonales. Contrairement aux autres organes, qui sont formés durant l'embryogenèse et qui conservent ensuite leur architecture tout le long de la vie adulte, la glande mammaire est soumise à des changements majeurs de sa morphologie à plusieurs stades de la vie adulte (Hennighausen and Robinson, 2005). Chez les humains, l'épithélium mammaire est formé d'un réseau de canaux interconnectés situés dans le tissu mammaire graisseux (Howard and Gusterson, 2000). Durant la puberté la croissance canalaire augmente rapidement grâce à une stimulation hormonale pour former un réseau mature (Howard and Gusterson, 2000). Le stade final de différenciation se fait pendant la grossesse et l'allaitement par la formation de structures en acini, qui contiennent les alvéoles sécrétrices de lait, grâce à une forte prolifération cellulaire suivie d'une étape de différenciation terminale (cf. figure 1 pour une vision schématique de la structure de la glande mammaire). Après le sevrage, la fin de la lactation est accompagnée d'une apoptose massive et d'un remodelage des tissus afin que la glande mammaire puisse reprendre sa structure originelle (Strange et al., 2001). Le tissu épithélial mammaire est donc composé de cellules qui ont un très fort pouvoir prolifératif ainsi que d'un potentiel de différenciation important. Ce fort pouvoir prolifératif

est soumis à un contrôle strict mais est exploité à de nombreuses reprises dans la vie d'une femme afin de répondre à ses besoins physiologiques. Malheureusement il arrive que les cellules épithéliales mammaires échappent aux mécanismes de contrôle de la prolifération et forment des tumeurs.

Le cancer du sein est la principale cause de mortalité par cancer chez la femme européenne. C'est un grave problème de santé publique puisqu'il touche 1 femme sur 10 et provoque 20 % des décès par cancer. Il s'agit d'une affection maligne multifactorielle dont les mécanismes sont, dans l'ensemble, encore mal compris. Cette incompréhension peut expliquer en partie que la mortalité n'ait pratiquement pas diminué depuis plus de 25 ans.

Les hormones stéroïdes, notamment les oestrogènes, jouent un rôle fondamental dans la genèse et la progression du cancer du sein humain. Des observations de Beatson, en 1896, avaient déjà établi l'importance de la régulation endocrine ovarienne sur le contrôle de la croissance métastatique du cancer du sein (Beatson, 1896). Soixante ans plus tard Elwood Jensen et ses collaborateurs ont montré que l'oestradiol était spécifiquement retenu dans les tissus cible de cette hormone. Cela amena à la découverte que l'action intracellulaire de l'oestradiol était assurée par un récepteur liant avec une haute affinité cette hormone (Jensen, 1962). Ce récepteur, initiant les effets des oestrogènes dans les tissus cibles des stéroïdes (Toft and Gorski, 1966) et présent dans les tumeurs mammaires (Jensen et al., 1969) a été identifié et nommé le récepteur des oestrogènes (RE). Le développement des ligands radio marqués a montré la présence des oestrogènes dans les noyaux des cellules, suggérant un rôle des oestrogènes dans le contrôle de la transcription (Jensen, 1966). Aujourd'hui, le RE est utilisé comme marqueur de pronostic dans les cancers mammaires. Son expression détermine si une thérapie anti-hormonale peut être associée aux thérapies classiques.

Les anti-oestrogènes, antagonistes des oestrogènes, sont un outil clinique de choix pour la prévention et le traitement du cancer du sein hormono-dépendant pour sa croissance. Le

Tamoxifène étant le plus couramment utilisé. Des études cliniques ont montré que chez les patientes atteintes de cancer du sein, le taux de mortalité après 5 à 10 ans est réduit de 20 à 25 % par ce traitement. Malheureusement chez les patients métastatiques, pour des raisons encore inexpliquées, il apparaît systématiquement une résistance à cette thérapie anti-hormonale au bout d'environ 3 ans de traitement. Toutefois dans la majorité des cas l'expression du RE $\alpha$  est maintenue dans ce type de tumeurs et son activité continue à réguler la croissance tumorale. Au niveau moléculaire les mécanismes potentiellement responsables de l'apparition de résistance aux anti oestrogènes sont multiples :

- des mutations du RE $\alpha$  entraînant une hyper sensibilité à l'oestradiol ou une interaction accrue avec ses co-activateurs et résultant en une activité plus importante du RE $\alpha$
- une augmentation ou une baisse, respectivement, du taux de co-activateur/co-répresseur du RE $\alpha$ , qui entraînent une altération de la réponse au Tamoxifène
- **des modifications post-traductionnelles, essentiellement des phosphorylations, du RE $\alpha$  ou bien de ses co-facteurs qui entraînent une activation ligand indépendante du RE $\alpha$ . Les facteurs de croissance qui activent de nombreuses voies de transduction du signal dans la cellule sont, pour la plus grande partie, responsables de ces modifications.**

Les facteurs de croissance paraissent jouer un rôle important dans ces phénomènes de résistance.

La plus grande partie de mes travaux de thèse ont consisté à mieux comprendre le dialogue qui existe entre oestrogènes et facteurs de croissance au niveau des mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$ . Nous avons choisi le facteur de croissance IGF-I car c'est un facteur impliqué dans le développement normal de la glande mammaire (Ruan and Kleinberg, 1999) et sa dérégulation peut être la cause du développement de tumeurs mammaires (Lee and Yee, 1995) ou d'apparition de résistance aux anti oestrogènes (Nicholson and Gee, 2000). De

nombreuses stratégies ont été développées pour bloquer différentes étapes du système IGF-I (pour des revues récentes : (Larsson et al., 2005; Yee, 2006)). Beaucoup de ces stratégies ont donné des résultats encourageants, pourtant certains problèmes demeurent, notamment sur l'efficacité à long terme de ces thérapies et de leur toxicité. Ainsi dans la pathologie du cancer du sein une étude plus approfondie du système IGF-I et de ses interactions avec le RE $\alpha$  reste nécessaire.

## **B/ Le RE $\alpha$ : structure, fonction et rôle physiologique**

Le récepteur des oestrogènes  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) est un facteur de transcription qui fait parti de la superfamille des récepteurs nucléaires (dont les membres principaux sont les récepteur des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes, des androgènes, de l'acide rétinoïque, de la progestérone et de la vitamine D). L'activité du facteur de transcription RE $\alpha$  est capitale pour une prolifération normale des cellules mammaires.

### 1/ Synthèse, structure et pharmacologie du RE

#### a/ Découverte du RE

Le gène codant le RE fut cloné à partir de cellules cancéreuses mammaires MCF7 en 1985 (Walter et al., 1985) et séquencé un an plus tard (Greene et al., 1986) . Une dizaine d'années plus tard un second type de récepteur des oestrogènes a été découvert, d'abord chez le rat (Kuiper et al., 1996) puis chez l'homme (Mosselman et al., 1996) et la souris (Tremblay et al., 1997). Ce nouveau type de récepteur a été nommé récepteur des oestrogènes  $\beta$  (Kuiper et al., 1996) par opposition au premier RE séquencé qui a été nommé RE $\alpha$ .

#### b/ Structure du RE

Les récepteurs nucléaires forment une famille de facteurs de transcription activés par les hormones stéroïdes (l'œstradiol, la progestérone, le cortisol..). Des analyses biochimiques

et des expériences de mutagenèse du RE et des autres récepteurs nucléaires ont mis en évidence que tous ces récepteurs possèdent une structure modulaire comprenant 6 régions distinctes (A-F) (Kumar et al., 1987). Les structures du RE $\alpha$  et du RE $\beta$ , ainsi que leur pourcentage d'identité au niveau de leur séquence en acides aminés, sont représentés schématiquement dans la figure 2.

#### Les différents domaines du RE $\alpha$

*Le Domaine A/B* N-terminal contient la fonction d'activation de la transcription ligand indépendante AF1 participant à l'activation de la transcription du RE (Gronemeyer, 1991; Tora et al., 1989b). Ce domaine est l'un des moins bien conservés, avec seulement 23% de similarité entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$ . La région N-terminale contenant le domaine AF1 est également très peu conservée entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  (18% d'identité de séquence). Cette disparité de séquence entre les RE $\alpha$  et  $\beta$  au niveau de la région N-terminale pourrait expliquer les différences de réponse entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  selon, le promoteur, le type cellulaire ou le ligand du RE (McInerney et al., 1998b). En effet, l'activité du domaine AF1 du RE $\beta$  est négligeable par rapport à celle du RE $\alpha$  (Cowley and Parker, 1999).

#### *Le domaine C*

Les récepteurs nucléaires sont caractérisés par un domaine C central qui est le plus conservé (88% d'homologies entre RE $\alpha$  et RE $\beta$ , ainsi qu'une conservation importante entre les espèces et entre les différents récepteurs nucléaires). Ce domaine permet la liaison des récepteurs nucléaires au niveau de séquences palindromique spécifiques. La première identifiée a été celle du récepteur des glucocorticoïdes (Karin et al., 1984). Pour le RE, la taille de ce domaine varie de 66 à 68 acides aminés. Le domaine C, domaine de liaison à l'ADN (DNA binding domain : DBD) cible le RE sur des séquences spécifiques d'ADN

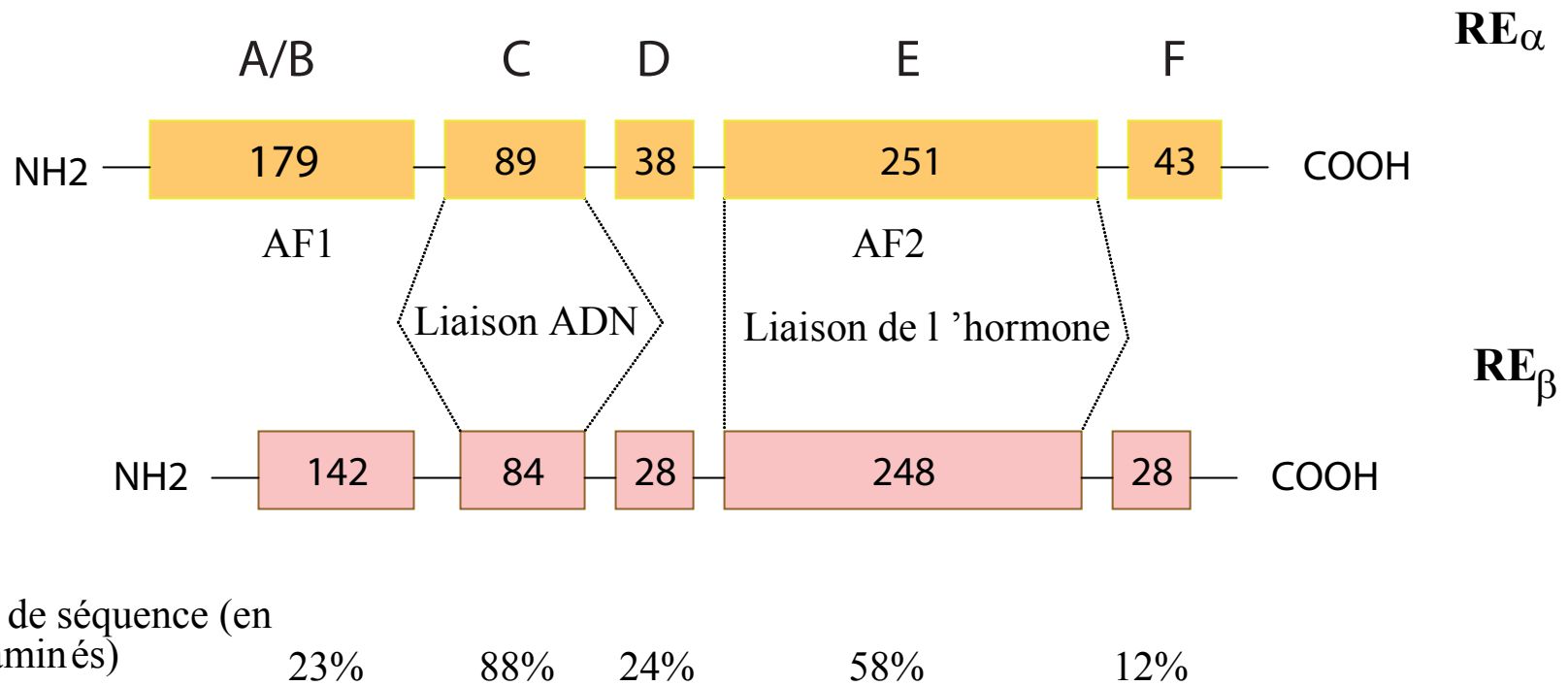


Figure 2 : *Domaine fonctionnels du récepteur des oestrogènes* – Les RE<sub>α</sub> et RE<sub>β</sub> ont une forte identité de séquence au niveau de la région de liaison à l'ADN (domaine C) et des domaines N- et C- terminaux assez peu conservés. Les chiffres dans les rectangles représentant les différents domaines indiquent le nombre d'acides aminés dans chaque région des protéines.

appelées Eléments de Réponse à l'œstradiol (ERE) (Kumar et al., 1986). La structure tridimensionnelle de ce domaine du RE a été résolue par résonance magnétique nucléaire. Ce domaine est monomérique en solution (Schwabe et al., 1990). La dimérisation artificielle du DBD permet de stabiliser sa liaison à un élément de réponse retrouvé dans plusieurs gènes oestrogéno-régulés (Kuntz and Shapiro, 1997). La structure globulaire du domaine ADN/DBD a été confirmée par cristallographie aux rayons X (Schwabe et al., 1993). Elle révèle que 2 motifs de liaison du zinc sont organisés pour former une seule unité structurale. Celle-ci les différencie des motifs à doigts de zinc présents dans d'autres facteurs de transcription qui sont structurés indépendamment les uns des autres (Lee et al., 1989).

#### *Le domaine D*

Le domaine D n'est pas conservé entre les différents récepteurs nucléaires. C'est une région charnière non structurée (Gronemeyer and Laudet, 1995). Elle contient en particulier des signaux de localisation nucléaire hormono-indépendants (Ylikomi et al., 1992).

#### *Le domaine E*

Le domaine E est bien conservé entre les récepteurs de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il contient le domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain : LBD) et la fonction d'activation de la transcription inductible par l'hormone (AF-2) (Tora et al., 1989b). Ce domaine permet la reconnaissance de l'hormone et assure à la fois spécificité et sélectivité de la réponse physiologique. Dans le cas du RE $\alpha$ , cette région est impliquée dans la localisation nucléaire et dans l'association *in vitro* avec la protéine de choc thermique hsp90 (Chambraud et al., 1990). Elle est aussi impliquée dans la dimérisation du récepteur (Kumar and Chambon, 1988; Tamrazi et al., 2002a) et interagit avec les coactivateurs transcriptionnels (Henttu et al., 1997; White et al., 1997). La structure cristallographique aux



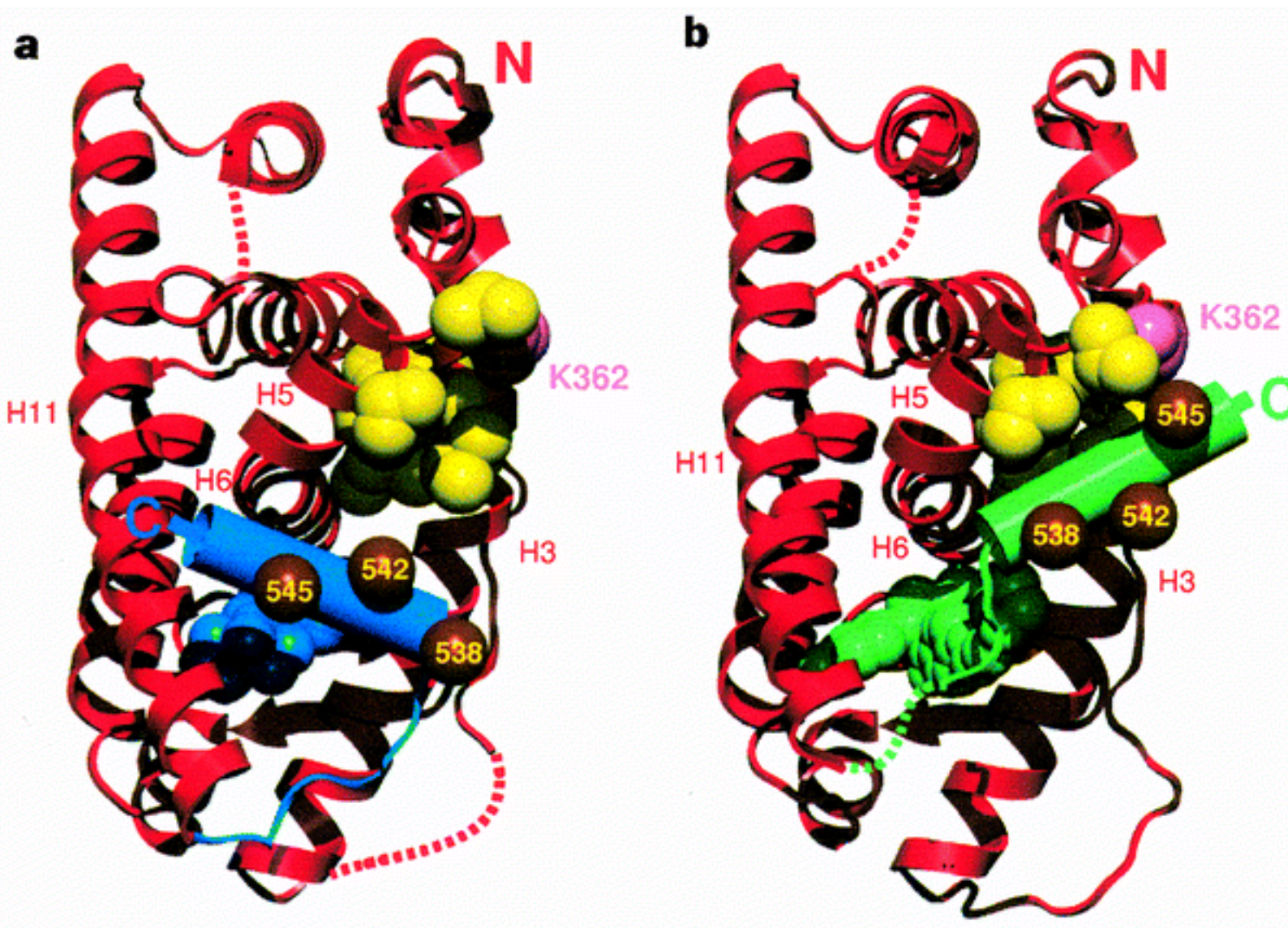


Figure 3 : Structure déterminée aux rayons X du domaine de liaison au ligand du RE $\alpha$ . – L'hélice 12 dont la position varie en fonction est représentée par un cylindre bleu dans le cas de la liaison à l'oestradiol (a) et en vert dans le cas de la liaison à l'anti œstrogène partiel Raloxifène (b).

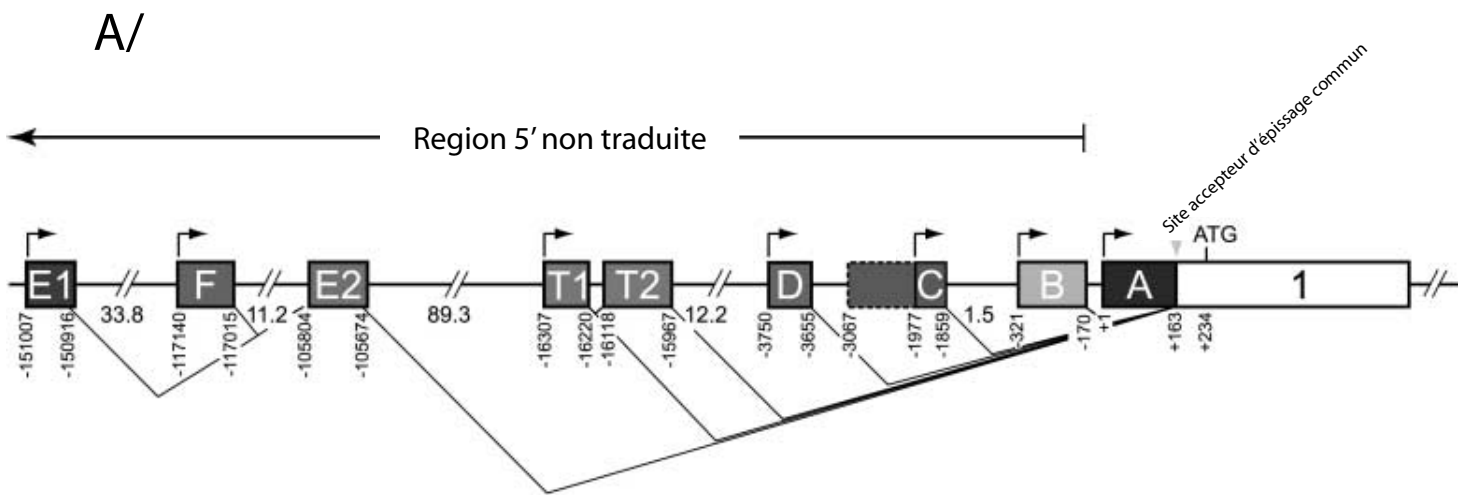
rayons X de ce domaine a été déterminée, en particulier, en présence de l'agoniste (17 $\beta$ -oestradiol) ou de l'antagoniste (Raloxifène) (Brzozowski et al., 1997a) (figure 3). Cette étude met en évidence le positionnement différent de l'hélice 12 de la partie C-terminale du domaine E en présence des différents ligands. Cette hélice 12 amphipathique est requise pour l'activation transcriptionnelle. En effet, elle ferme la cavité de liaison comme un couvercle et génère une fonction d'activation AF-2 compétente, générant un motif protéique capable d'interagir avec les co-activateurs transcriptionnels. Au contraire, l'antagoniste ne permet pas le positionnement de l'hélice 12 au dessus de la cavité ce qui empêche la formation d'un domaine AF-2 compétent (Nichols et al., 1998; Shiao et al., 1998). L'ensemble de ces études démontre qu'il existe des bases structurales au mécanisme d'action des anti-oestrogènes.

#### *Le domaine F*

Le domaine F est peu conservé parmi les récepteurs de la superfamille au niveau de sa séquence. Sa fonction reste mal définie mais de par sa position par rapport à l'hélice 12, il est probablement impliqué dans les mécanismes d'action des antagonistes (Montano et al., 1995; Nichols et al., 1998; Schwartz et al., 2002). Plus précisément, des études de mutagenèse dirigée ont montré que ce domaine est capable de moduler l'activité agoniste/antagoniste du Tamoxifène. Par exemple la double mutation S559A/E562A élimine l'activité agoniste du Tamoxifène tandis que la mutation Q565P augmente l'activité antagoniste du Tamoxifène (Schwartz et al., 2002).

#### *c/ Les gènes codant RE $\alpha$ et RE $\beta$*

Le gène codant le RE $\alpha$  est localisé sur le chromosome 6 au locus 6q25.1. Il est organisé en 8 exons dont la transcription est sous le contrôle de 7 promoteurs (Kos et al., 2001) (figure 4). L'usage de ces différents promoteurs conduit à des variants d'ARNm qui diffèrent par leur



B/

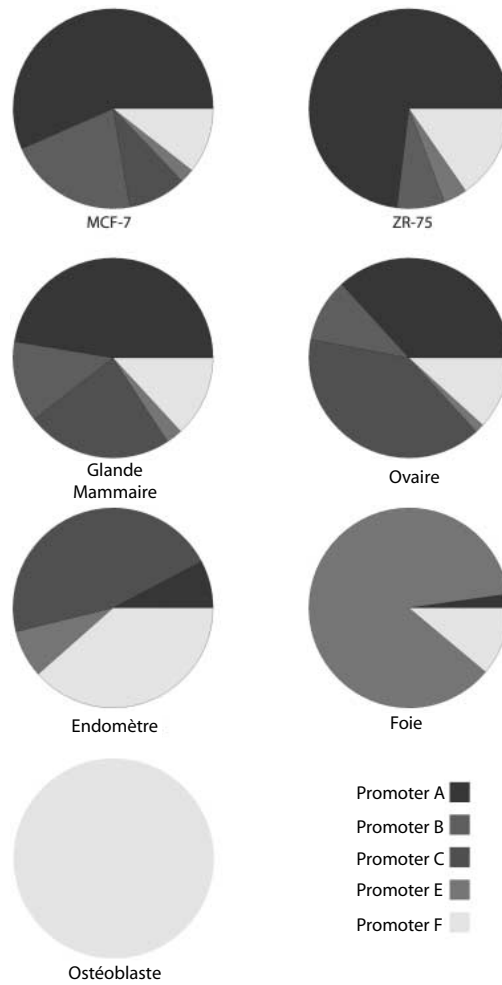


Figure 4 : A/ Structure du gène codant le RE $\alpha$ . Les différents rectangles avec les lettres correspondent aux exons non codants et les flèches correspondent aux différents promoteurs. B/ Répartition de l'utilisation des promoteurs du gène codant le RE dans les lignées cancéreuses et les tissus humains.

région 5' non traduite. Dans tous les cas, une même protéine de 66 kDa est produite. L'utilisation de ces différents promoteurs varie en fonction du type cellulaire (figure 4), ce qui permet la régulation de la quantité de transcrits synthétisés. Une isoforme du RE $\alpha$  a été trouvée dans les ostéoblastes où seul le promoteur F est utilisé (Denger et al., 2001). Par épissage alternatif, l'exon 1 est supprimé ce qui permet la formation d'un nouveau codon AUG situé dans l'exon 2. Ce transcrit plus court permet la synthèse d'un RE $\alpha$  de 46 kDa (RE $\alpha$ 46). Cette isoforme a aussi été détectée dans des lignées cancéreuses mammaires (Flouriot et al., 2000). Cette forme du RE $\alpha$  ne possède pas de domaine d'activation de la transcription ligand indépendant domaine AF-1. Le rôle exact du RE $\alpha$ 46 reste assez flou. Il a toutefois été démontré que le RE $\alpha$ 46 non ligandé est capable de réprimer la transcription de ses gènes cibles (Metivier et al., 2002). Le RE $\alpha$ 46 est aussi capable de supprimer l'activité transcriptionnelle AF1 dépendante du RE $\alpha$  pleine taille (Flouriot et al., 2000).

Le gène codant le RE $\beta$  est localisé sur le chromosome 14 entre les loci 14q11.1 et 14q11.2. Comme le RE $\alpha$ , il est organisé en 8 exons. Le gène RE $\beta$  code une protéine de 530 acides aminés d'environ 60kD. Dans la glande mammaire, des variants d'épissage du RE $\beta$  ont été mis en évidence, dont les plus connus sont le RE $\beta$ <sub>ins</sub> (Chu and Fuller, 1997) et le RE $\beta$ <sub>cx</sub> (Ogawa et al., 1998b). Le RE $\beta$ <sub>ins</sub> contient un insert de 18 acides aminés dans le domaine de liaison au ligand. Cette isoforme ne peut pas lier l'œstradiol et est un dominant négatif du RE $\alpha$  et du RE $\beta$  quand ils sont co-exprimés dans la cellule (Hanstein et al., 1999; Maruyama et al., 1998). L'expression du RE $\beta$ <sub>ins</sub> varie au cours du développement. Il est dominant dans la glande mammaire pré-pubère et pendant la lactation. Le RE $\beta$ <sub>ins</sub> n'est pas détecté dans les cellules cancéreuses mammaires par contre RE $\beta$ <sub>cx</sub> est exprimé comme ARN et comme protéine (Ogawa et al., 1998b). Le RE $\beta$ <sub>cx</sub> ne lie pas l'œstradiol et se comporte comme dominant négatif du RE $\alpha$  (Zhao et al., 2007).

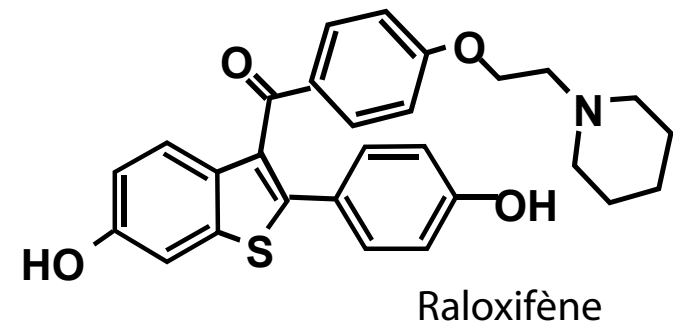
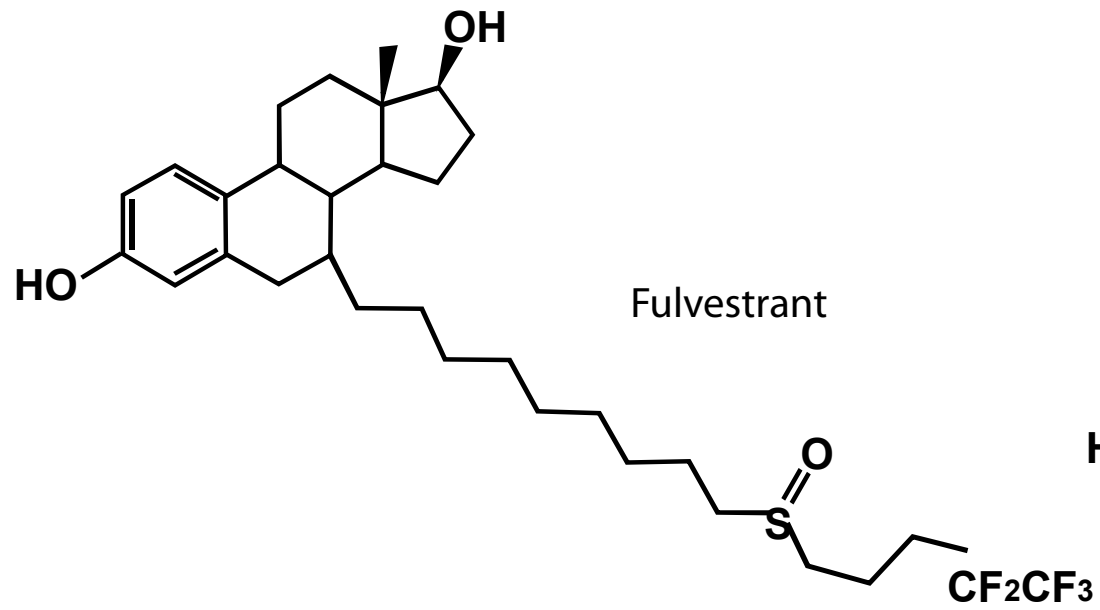
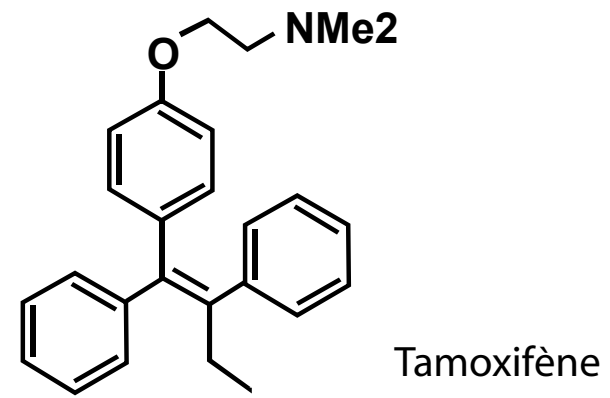
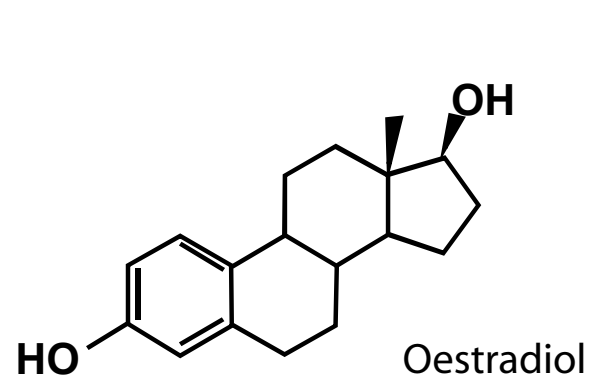


Figure 5 : Structure de l'oestradiol et de trois anti-oestrogènes

## d/ Les ligands du RE

### *Les oestrogènes*

Le ligand naturel du récepteur des œstrogènes est l'œstradiol (voir figure 5). C'est une hormone stéroïde synthétisée principalement dans l'ovaire qui agit sur de nombreux organes cibles, en particulier ceux du système reproductif femelle (glande mammaire, ovaire, utérus et vagin). Mais les œstrogènes jouent aussi un rôle important dans le maintien de la minéralisation osseuse et dans le système cardio-vasculaire où ils ont un effet « protecteur ». Les œstrogènes sont des dérivés du cholestérol et sont lipophiles. Ils diffusent librement à travers la bicouche lipidique de la membrane cellulaire et sont retenus avec une haute affinité et une grande spécificité dans les cellules cibles par le récepteur des œstrogènes.

### *Les anti oestrogènes*

Puisque les oestrogènes jouent un rôle fondamental dans la genèse et la progression du cancer du sein, l'utilisation de composés antagonistes des oestrogènes est une approche thérapeutique de choix. Le but est d'obtenir des agents qui agiront comme agonistes dans les tissus où les oestrogènes sont bénéfiques comme dans l'os, le cerveau et le système cardio-vasculaire et comme antagonistes dans les organes atteints d'une tumeur dont la prolifération est stimulée par les œstrogènes.

***Les agonistes partiels*** – Les agonistes partiels du RE sont appelés SERMs pour Selective Estrogen Receptor Modulators. Ces molécules se comportent comme des agonistes ou des antagonistes du RE, selon le tissu dans lequel ils vont exercer leur action.

Dans le cancer du sein, le Tamoxifène est l'anti œstrogène qui jusqu'à présent était le plus couramment utilisé. Il a une structure triphényl-éthylénique non stéroïde (voir figure 5). Le Tamoxifène est converti, majoritairement dans le foie, en 4-hydroxyTamoxifène (OH-Tam).

Cette conversion augmente son affinité pour le RE de 100 fois environ et donc son activité. La chaîne alkylamide latérale est essentielle pour son activité anti-œstrogène (Jordan, 1984). Etant agoniste partiel de l'œstradiol, il exerce des effets bénéfiques comme le maintien de la densité osseuse chez les femmes post-ménopausées (Freedman et al., 2001; Kinsinger et al., 2002) mais il a des effets indésirables dans l'utérus où il augmente les risques de cancer de l'endomètre. Le Tamoxifène augmente aussi l'incidence des accidents vasculaires cérébraux. Toutefois son utilisation a permis de réduire le taux de mortalité de 20 à 25 % après 5 ans de traitement (Bentley et al., 1992). Malheureusement, chez les patientes métastatiques il apparaît de manière quasi systématique une résistance aux anti-oestrogènes au bout de quelques années de traitement.

Le Raloxifène est un benzothiophène dont la structure tridimensionnelle est similaire aux triphényléthylènes. Etant agoniste partiel de l'œstradiol, il exerce des effets bénéfiques dans le maintiens de la densité osseuse chez les femmes post-ménopausées et contrairement au Tamoxifène, il se comporte comme un antagoniste dans l'utérus (Cummings et al., 1999).

***Les antagonistes purs*** - L'ICI 182 780, synthétisé selon la méthode décrite à la fin des années 1970 (Bucourt et al., 1978)(ICI pour « Imperial Chemical Industrie »), actuellement appelé Fulvestrant ou Falsodex, est un anti-œstrogène stéroïdien. Il est considéré comme le plus prometteur des nouveaux anti-oestrogènes (voir figure 5). Il semble totalement dépourvu d'activité agoniste (Wakeling et al., 1991). Son utilisation peut être combinée à des thérapies contre l'ostéoporose.

#### *Les phyto oestrogènes*

Les phyto oestrogènes sont des composés non stéroïdiens présents dans de nombreux végétaux et partagent des similitudes de structure avec les oestrogènes. Les 3 principaux

groupes sont les isoflavones (fèves de soja...), les lignans (aliments à grains entiers) et les coumestans. Les lignans comme les isoflavones se lient aux récepteurs des oestrogènes. Ils exercent un effet antagoniste partiel au niveau des tissus cibles, selon les sites d'actions, le niveau d'oestrogènes endogène et le niveau des récepteurs. Les données géographiques soutiennent l'existence d'une relation inverse entre un régime alimentaire riche en phytoestrogènes et l'incidence du cancer du sein. Effectivement, les femmes asiatiques ont un risque 4 à 6 fois plus faible de développer un cancer du sein que les femmes occidentales (Adlercreutz, 2002). Mais aucune étude clinique rigoureuse ne permet, à ce jour, de recommander un régime riche en phyto-oestrogènes aux femmes ayant reçu un diagnostic de cancer.

#### e/ Modèle d'étude : le gène oestrogéno-régulé pS2/TFF1

A l'origine, pS2/TFF1 a été identifiée dans les cellules hormono-dépendantes MCF7 sur la base de sa régulation transcriptionnelle par l'oestradiol (Brown et al., 1984; Masiakowski et al., 1982). La protéine maturée pS2/TFF1 est un polypeptide de 6,5 Kda exprimée dans les tumeurs du sein RE+ où son rôle est inconnu. Elle a aussi été détectée dans l'épithélium gastrique normal (Rio et al., 1988). La structure de la protéine a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (Polshakov et al., 1997) et contient une structure en forme de trèfle retrouvée chez une douzaine de protéines extracellulaires. Ainsi la protéine initialement baptisée pS2 a été renommée TFF1 pour Trefoil Factor 1.

Le rôle biologique de pS2/TFF1 n'est pas encore tout à fait clair. Il a été suggéré que pS2/TFF1 puisse jouer un rôle important dans la réparation gastro-intestinale chez la souris (Playford et al., 1996) et fonctionne comme gène suppresseur de tumeur spécifique du tissu gastrique chez la souris (Lefebvre et al., 1996). Toutefois des travaux récents montrent que



pS2/TFF1 favorisait la progression d'adéno carcinomes dans des cellules épithéliales du colon (Rodrigues et al., 2006).

La région 5' du gène pS2/TFF1 contient une région complexe, cible des œstrogènes, de l'EGF, des ester de phorbol (inducteurs de tumeurs), de l'oncoprotéine Ha-ras et de la protéine c-jun (Nunez et al., 1989) et une site AP1 potentiel (Gillesby et al., 1997). L'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) a été caractérisé. C'est une séquence palindromique imparfaite (Berry et al., 1989a). Il a été proposé que la méthylation des îlots CpG localisés dans la séquence 5' du gène pS2/TFF1 soit impliquée dans la répression de son expression dans les cellules de cancer du sein RE négatives (Martin et al., 1995; Martin et al., 1997). La structure chromatinienne du promoteur proximal de pS2/TFF1 a été déterminée à haute résolution (Sewack and Hansen, 1997). Cette région contient deux nucléosomes précisément positionnés et le traitement hormonal, concomitant avec l'induction transcriptionnelle, résulte dans le changement de la structure chromatinienne de cette région (Giamarchi et al., 1999).

## 2/ Rôle biologique du RE

Le RE fait parti de la superfamille des récepteurs nucléaires. C'est un facteur de transcription actif lorsqu'il lie son ligand naturel : l'œstradiol.

### a/ Expression tissulaire

Des études de RT-PCR, de northern blot, d'immunohistochimie et d'hybridation in situ ont montré que le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  sont localisés principalement au niveau du système reproducteur féminin (sein, utérus). On les retrouve aussi dans le foie, le colon, le cerveau, le système cardio vasculaire, le tractus uro-génital et l'os (Enmark et al., 1997; Kuiper et al., 1997; Taylor and Al-Azzawi, 2000). Dans un même tissu, le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  peuvent posséder des localisations spécifiques. Ainsi, dans l'ovaire, le RE $\alpha$  est largement présent dans les

cellules de la thèque et les cellules interstitielles, alors que le RE $\beta$  est prédominant dans les cellules de la granulosa (Hiroi et al., 1999; Sar and Welsch, 1999). Dans la prostate, le RE $\beta$  est localisé dans l'épithélium tandis que le RE $\alpha$  est localisé dans le stroma (Weihua et al., 2002). Récemment, plusieurs études réalisées sur le sein, l'ovaire, le colon et la prostate ont montré la sous expression du RE $\beta$  (ARNm et protéine) dans le tissu tumoral comparé aux tissus sains (Campbell-Thompson et al., 2001; Fixemer et al., 2003; Leygue et al., 1998; Pujol et al., 1998; Roger et al., 2001). Il semble que le rapport RE $\alpha$ /RE $\beta$  augmente au cours de la tumorigénèse, suggérant ainsi que ces deux protéines aient des rôles différents au cours de ce processus.

Concernant le cancer du sein, les tumeurs exprimant le RE $\alpha$  sont plus différenciées et ont un potentiel métastatique plus faible que les tumeurs ne l'exprimant pas (Volpi et al., 2000). Elles sont également de meilleur pronostic puisque l'hormonothérapie est envisageable. En revanche le rôle du RE $\beta$  reste à ce jour très controversé. En effet certaines études présentent le RE $\beta$  comme un marqueur de mauvais pronostic puisque les tumeurs co-exprimant le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  sont associées à un envahissement ganglionnaire et à un grade histologique élevé et le taux d'ARNm de RE $\beta$  est élevé dans les tumeurs qui ont développé une résistance au Tamoxifène (Speirs et al., 1999). Cependant, dans d'autres études le RE $\beta$  est considéré comme un marqueur de bon pronostic. Ainsi l'expression du RE $\beta$  est associée à un grade histologique faible et à une absence d'envahissement ganglionnaire dans les tumeurs mammaires (Jarvinen et al., 2000; Omoto et al., 2001). Par ailleurs le taux de RE $\beta$  diminue dans les tumeurs pré invasives prolifératives (Roger et al., 2001). Ces divergences sur l'impact pronostic du RE $\beta$  pourraient être dues à l'expression de différents variants. En effet certains variants pourraient être des marqueurs de bon pronostic tandis que d'autres n'auraient aucun impact. Par exemple le RE $\beta$ cx semble être associé à de meilleures chances de survie

tandis que le RE $\beta$  pleine taille ne semble avoir aucun impact sur l'incidence de survie (Davies et al., 2004).

#### b/ Rôle dans l'appareil reproducteur

Afin de déterminer l'effet de la suppression du RE au niveau d'un organisme, de nombreuses souris invalidées pour le RE $\alpha$  ou le RE $\beta$  ont été générées (pour revues (Couse et al., 2000; Curtis and Korach, 2000). Ces travaux ont montrés que d'une part l'invalidation du RE $\alpha$  et/ou du RE $\beta$  n'est pas létal pour l'organisme et que les souris survivent jusqu'à l'âge adulte. D'autre part les deux récepteurs semblent avoir des fonctions biologiques distinctes. Chez la souris, l'invalidation du gène codant le RE $\alpha$  se traduit par une stérilité chez les mâles et les femelles (Lubahn et al., 1993). De plus on peut noter chez les femelles une absence de développement des tissus mammaires et des troubles du comportement importants (agressivité, infanticide), soulignant le rôle fondamental du RE $\alpha$  sur le développement normal des caractères sexuels (Ogawa et al., 1998a; Ogawa et al., 1996; Rissman et al., 1997). Ces résultats ont été confirmés par des travaux récents où l'invalidation sélective du RE $\alpha$  par RNAi au niveau de l'hypothalamus de souris conduit au même résultat : la perte du comportement sexuel féminin (Musatov et al., 2006).

Les souris femelles obtenues après invalidation du gène codant le RE $\beta$  présentent un comportement sexuel et un développement de la glande mammaire normaux mais une diminution de la fertilité résultant d'une diminution de la fonction ovarienne (Krege et al., 1998; Ogawa et al., 1999). En ce qui concerne les souris mâles dont le gène codant le RE $\beta$  a été invalidé, elles sont fertiles et ont un comportement sexuel normal (Ogawa et al., 1999). Ces données indiquent que le RE $\beta$  est requis pour une ovulation optimale mais pas pour la différenciation de comportement mâle/femelle, la fertilité ou encore la lactation.

La double invalidation des gènes codant le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  génère une infertilité chez les 2 sexes. Les ovaires des souris adultes femelles présentent une transdifférenciation folliculaire vers des structures ressemblant aux tubes séminifères des testicules (Couse et al., 1999). Les mâles quant à eux présentent une diminution du nombre et de la mobilité des spermatozoïdes (Couse et al., 1999) ainsi qu'une perte des comportements sexuels (Ogawa et al., 2000).

#### c/ Rôle dans l'os

Les oestrogènes jouent un rôle dans la croissance de l'os (ostéoblastes et ostéoclastes) lors de la puberté et dans son renouvellement à l'âge adulte. Chez les hommes comme chez les femmes, une déficience en œstrogènes est associée à une hausse du remodelage de la structure osseuse pouvant conduire à une ostéoporose (Manolagas, 2000; Manolagas et al., 2002; Riggs et al., 1998, 2002). RE $\alpha$  et RE $\beta$  sont exprimés dans les mêmes proportions dans les ostéoblastes mais aussi, dans des quantités plus faibles, dans les ostéoclastes. L'effet des oestrogènes sur le tissu osseux se traduit par une fonction pro apoptotique dans les ostéoclastes et une fonction anti apoptotique dans les ostéoblastes (Manolagas et al., 2002).

#### d/ Rôle dans le système cardio-vasculaire

Chez les femmes entre 35 et 65 ans, le risque cardio-vasculaire est plus bas que celui des hommes au même âge, mais le risque des femmes rejoint progressivement celui des hommes après la ménopause. Cela suggère que l'œstradiol (E2) puisse être responsable d'un effet athéroprotecteur. Dans les modèles animaux, l'œstradiol prévient la constitution de la strie lipidique (premiers stades de l'athérosclérose). L'utilisation des souris ERKO (souris dont le gène codant le RE $\alpha$  ou le RE $\beta$  a été invalidé) a permis de démontrer que cet effet dépend spécifiquement du RE $\alpha$  (Darblade et al., 2002).

#### e/ Rôle dans le cerveau

Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau (Shughrue and Merchenthaler, 2000). L'injection d'oestradiol radioactif dans des souris ER $\alpha$  KO entraîne un marquage de certaines régions du cerveau. Cela démontre que le RE $\beta$  est capable d'interagir avec E2 indiquant que l'ARNm de RE $\beta$  détecté dans certaines aires du cerveau est bien traduit en une protéine active (Shughrue et al., 1999). Plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'utilisation d'oestrogènes chez les femmes ménopausées est associée à une diminution de l'incidence de la maladie d'Alzheimer (Paganini-Hill, 1996; Tang et al., 1996; Zandi et al., 2002). Par contre une thérapie combinée d'oestrogènes et de progestines augmente les risques de démence chez les femmes de plus de 65 ans (Shumaker et al., 2003).

D'autres études dans des souris males invalidées pour le gène codant le RE $\beta$  ont montré que ces souris présentent des anomalies cérébrales entraînant une dégénérescence des corps cellulaires neuronaux avec l'âge, suggérant un rôle protecteur du RE $\beta$  dans le développement de maladies neurodégénératives (Wang et al., 2001b).

L'existence des 2 types de récepteurs pourrait être à l'origine du large spectre d'activité des oestrogènes dans différents tissus et de quelques uns des effets paradoxaux des anti-oestrogènes.

### **C/ Mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$ et leurs régulations**

#### 1/ Activation du RE $\alpha$ : du ligand à la liaison à l'ADN

##### a/ HSP90

Contrairement aux autres récepteurs nucléaires, tous les récepteurs des hormones stéroïdes non liés à l'hormone sont associés à un complexe multiprotéique de protéines

auxiliaires. Ces protéines incluent les protéines de choc thermique hsp90, la première identifiée (Catelli et al., 1985), hsp70 (Ratajczak et al., 1993) et la protéine p59 (Renoir et al., 1990), une protéine de la famille des immunophilines (prolyl-isomérase)(Lebeau et al., 1992). En absence de ligand, le RE est retrouvé sous forme d'un complexe aporecepteur composé d'un monomère de RE, d'un dimère de la hsp90 (Redeuilh et al., 1987) et de plusieurs autres protéines (Segnitz and Gehring, 1995). La hsp70 et les autres membres du complexe semblent former avec la hsp90 un complexe qui se lie au récepteur sans ligand pour le maintenir dans une conformation en attente du ligand, prêt à répondre au signal (pour une revue voir (Bohen et al., 1995)). L'interaction RE/hsp90 a été bien étudiée. Plusieurs régions du RE sont impliquées dans la formation du complexe avec la hsp90. Ces régions ont été mises en évidence par l'analyse des complexes formés entre des mutants du RE et la hsp90 (Chambraud et al., 1990). La localisation subcellulaire de la hsp90 a été déterminée par immunodétection et microscopie confocale. Cette protéine est très abondante dans la cellule et majoritairement cytoplasmique. Le récepteur fait la navette entre le cytoplasme et le noyau, il interagit dans le cytoplasme avec la hsp90 et le complexe formé passe dans le noyau (Meng et al., 1996). Suite à la liaison du ligand, le RE "activé" se dissocie du complexe des protéines chaperones.

La hsp90 est aussi une cible thérapeutique car elle est la cible d'un agent anti-tumoral, la geldanamycine. La structure du complexe hsp90/geldanamycine a permis d'expliquer le mode d'action de cette drogue (Stebbins et al., 1997). Cet antibiotique, en se liant à la hsp90 au niveau du site de liaison de l'ATP, empêche la maturation conformationnelle des protéines par la hsp90, ce qui entraîne leur dégradation.

| Composés   | Affinité relative des ligands<br>(17 $\beta$ oestradiol = 100) |                        |
|--|--|------------------------|
|  | RE $\alpha$  | RE $\beta$             |
| <i>Estrogènes</i>  |  |                        |
| Estrone  | 60   | 37                     |
| Estriol  | 14   | 21                     |
| <i>Anti oestrogènes</i>                                  |  |                        |
| Tamoxifène   | 7  | 6                      |
| 4-Hydroxytamoxifène                                      | 178  | 339                    |
| Raloxifène   | 85   | 166                    |
| ICI 164,384 (analogue du Fulvestrant)                    | 69   | 16                     |
| <i>Oestrogènes environnementaux et phyto oestrogènes</i> |  |                        |
| Genistéine (molécule présente dans le soja)              | 5  | 36                     |
| Resvératol (molécule présente dans le vin)               | <1,1 x 10 <sup>4</sup>   | <1,6 x 10 <sup>4</sup> |
| p'-DDE (dérivé du DDT)                                   | < 0,01   | < 0,01                 |

Table 1 : *Affinité relative de différents ligands du récepteur des oestrogènes* – Ces valeurs relatives d'affinité de l'oestradiol pour le RE $\alpha$  ou le RE $\beta$  sont tirées des travaux suivants : (Bowers et al., 2000; Kuiper et al., 1997; Kuiper et al., 1998). Les méthodes pour évaluer l'affinité de liaison au RE diffèrent mais les trois études expriment les affinités de liaison des différents ligands du RE par rapport à l'oestradiol, dont l'affinité est arbitrairement fixée à 100.

#### b/ Liaison du ligand

L'affinité du RE $\alpha$  et du RE $\beta$  pour les différents ligands semble être du même ordre de grandeur. Ainsi, le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  ont une affinité élevée pour le 17 $\beta$ -oestradiol avec une constante de dissociation de 0,1 nM et de 0,4 nM, respectivement, et pour l'OH-Tam, avec une constante d'inhibition  $K_i$  de 0,1 nM pour le RE $\alpha$  et de 0,04 nM pour le RE $\beta$  (Kuiper et al., 1997)(et cf table 1 pour une idée de l'affinité de plusieurs ligands du RE).

#### c/ Changement de conformation

Le domaine de liaison à l'hormone (le LBD) du RE $\alpha$  change de conformation suite à sa liaison à l'agoniste. Ce changement se traduit par le repositionnement de l'hélice 12 en C-terminal du LBD et permet le passage à une forme transcriptionnellement active du RE $\alpha$ .

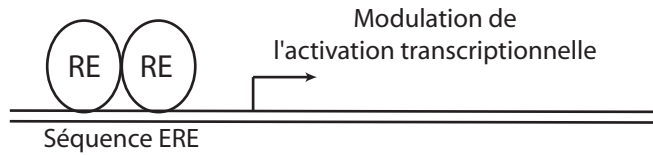
#### d/ Dimérisation

Le fait que la séquence régulatrice à laquelle se fixe le RE ait une structure palindromique suggère que le RE lie l'ERE sous forme de dimère ((Kumar and Chambon, 1988; Schwabe et al., 1993; Whang et al., 1995).

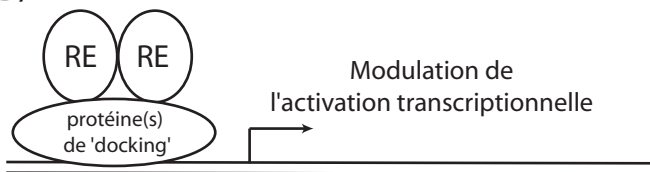
La formation de dimères semble être essentielle pour le fonctionnement normal du RE $\alpha$  car des mutations qui bloquent sa dimérisation entraînent généralement l'inactivation du RE (Lees et al., 1990). Le principal domaine responsable de la dimérisation du RE se trouve au niveau du domaine E. La surface de dimérisation est assez importante et représente 15% de la surface de chaque monomère (Brzozowski et al., 1997b). Le RE existe sous forme de dimère, même en absence de ligand et cette interaction est résistante a de fortes concentrations en agent dénaturants (Salomonsson et al., 1994). Toutefois les ligands du RE (agonistes comme antagonistes) entraînent une stabilisation des dimères de RE $\alpha$  (Tamrazi et al., 2002b).



A/



B/



Site de fixation du complexe AP1  
ou de la protéine Sp1

Figure 6 : Représentation simplifiée de la fixation du RE $\alpha$  sur les promoteurs de ses gènes cibles. A/ Le RE $\alpha$  se fixe directement sur l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE). B/ Le RE  $\alpha$  se fixe à l'ADN par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription tels que le complexe AP1 ou la protéine Sp1.

Le RE $\alpha$  est capable de s'hétérodimériser avec le RE $\beta$  (Cowley et al., 1997; Hall and McDonnell, 1999; Ogawa et al., 1998b) formant ainsi des homodimères RE $\alpha$ , des hétérodimères RE $\alpha$ /RE $\beta$ , et des homodimères RE $\beta$ . L'interface précise de dimérisation entre ces récepteurs n'est pas encore déterminée. La distribution des homodimères et hétérodimères des RE dépendent en partie de l'expression des 2 types de récepteurs qui est variable dans les différents types cellulaires. La capacité des 2 types de RE à former des hétérodimères introduit un niveau de régulation supplémentaire dans la transduction du signal via les œstrogènes (Hall and McDonnell, 1999).

#### e/ Liaison du RE à l'ADN

##### *Fixation directe à l'ADN : les ERE*

La superfamille des récepteurs nucléaires est subdivisée en 2 classes sur la base de leur type de dimérisation et leurs propriétés de liaison à l'ADN (Mangelsdorf et al., 1995). Les récepteurs de classe I sont les récepteurs aux hormones stéroïdes qui s'homodimérisent et lient un élément de réponse organisé en 2 séquences inversement répétées. Les récepteurs de classe II dont les récepteurs de la vitamine D, de l'hormone thyroïdienne et de l'acide rétinoïque partagent un partenaire commun d'hétérodimérisation, le récepteur rétinoïde X (RXR). Les récepteurs de classe II lient des éléments de réponse organisés en 2 séquences directement répétées (Truss and Beato, 1998; Trust et al., 1993). Le RE est un récepteur de classe I qui lie un élément de réponse aux œstrogènes appelé "Estrogen Responsive Element" (ERE) (voir figure 6).

La comparaison de 23 éléments de réponse fonctionnels a permis de définir un ERE consensus (Anolik et al., 1993). C'est une séquence palindromique parfaite de 13 paires de bases, organisées en 2 hexamères séparés par 3 nucléotides de séquence aléatoire GGTCANNN TGACC.

Parmi les ERE naturels, certains sont des palindromes parfaits, tel l'ERE de la vitellogenine A2 de xénope (Seiler-tuyns et al., 1986) et de poulet (Jost et al., 1984). Cependant, la plupart des EREs sont dégénérés par rapport au consensus. C'est le cas de l'ERE du promoteur de pS2/TFF1 (Berry et al., 1989b) et du demi ERE du promoteur de la cathepsine D (Augereau et al., 1994). En fonction de son ligand, le RE adopte des conformations différentes qui permettent ou non la reconnaissance des différents ERE. Mais, le RE adopte aussi différentes conformations quant il est lié à différents ERE (Ramsey and Klinge, 2001; Wood et al., 1998; Wood et al., 2001), ce qui conforte l'idée que des bases structurales sont impliquées dans les mécanismes d'action des anti-oestrogènes. Le RE, complexé à un ligand agoniste ou antagoniste, a la même affinité pour l'ERE (Cheskis et al., 1997). Le RE non ligandé se fixe aussi sur l'ERE *in vivo* (Reid et al., 2003; Szatkowski Ozers et al., 1997). L'homodimère RE $\alpha$  et l'hétérodimère RE $\alpha$ /RE $\beta$  ont une meilleure affinité pour l'ERE que l'homodimère RE $\beta$ .

#### *Le « docking » : interaction du RE avec un facteur liant l'ADN*

Les RE activent la transcription de leurs gènes cibles en interagissant soit directement avec les ERE soit en s'associant à des facteurs de transcription liant eux-mêmes l'ADN comme le complexe AP-1 ou la protéine Sp1 (voir figure 6) (Klinge, 2000; Safe, 2001; Webb et al., 1995).

### 2/ Les partenaires du RE $\alpha$ dans l'activation de la transcription

#### a/ Mise en évidence des facteurs modulant l'activité du RE $\alpha$

Le fait que l'activité transcriptionnelle des ligands du RE $\alpha$  soit tissu spécifique suggère que le RE $\alpha$  ne fonctionne pas de manière isolée mais plutôt qu'il existe des facteurs spécifiques de certains types cellulaires qui permettent de moduler l'activité du RE $\alpha$ . De plus

de nombreuses études ont mis en évidence qu'il existe un phénomène d'interférence transcriptionnelle (ou squelching) entre les différents récepteurs nucléaires. Ce terme fait référence au mécanisme par lequel l'activité transcriptionnelle d'un récepteur, au niveau de ses gènes cibles, peut être supprimée par la surexpression d'un autre récepteur nucléaire qui va titrer un ou plusieurs de ses partenaires communs. Il a été montré par exemple que le RE $\alpha$  peut inhiber l'activité transcriptionnelle du récepteur des glucocorticoïdes ou du récepteur de la progestérone au niveau de gènes ne contenant pas de séquences EREs (Meyer et al., 1989). L'ensemble de ces observations montre qu'il existe des facteurs en quantité limitante capable d'interagir avec les récepteurs nucléaires et de moduler leur activité transcriptionnelle.

#### b/ Identification des cofacteurs interagissant avec le domaine AF2 du RE $\alpha$

Les premiers partenaires du RE $\alpha$  ont été identifiés par Halachimi et ses collaborateurs qui ont utilisés le domaine LBD du RE $\alpha$ , lié à l'oestradiol, pour purifier une protéines de 160 kilodaltons appelée ER $\alpha$  Associated Protein (ERAP 160) (Halachmi et al., 1994) dont l'interaction avec RE $\alpha$  requiert un domaine AF2 intact. De plus, bien que la protéine ERAP 160 puisse interagir avec les autres récepteurs nucléaires, elle n'interagit pas avec les autres facteurs de transcription, ce qui indique qu'il existe un certain degré de spécificité. Ensuite des études ultérieures ont mis en évidence d'autres facteurs interagissant avec le RE $\alpha$  et les autres récepteurs nucléaires dont on peut citer TIF1 (Transcription Intermediary Factor 1), RIP 140 et RIP 160 (Receptor Interacting Proteins 140 et 160), hRPF1 (human Receptor Potentiating Factor 1) etc.(pour une revue complète sur ces partenaires du RE $\alpha$  (McKenna et al., 1999)et cf. table 2). Mais ce n'est qu'avec le clonage et la caractérisation de SRC1 (Steroid Receptor Coactivator 1) qu'un rôle spécifique de cette classe de protéines sur l'action du RE $\alpha$  a été établi. SRC1 a été identifié par double hybride en utilisant le domaine LBD du récepteur de la progestérone comme appât. Il a ensuite été montré que SRC1 interagissait avec

|                                     | CoFacteur          | Nom complet  | Fonction/activité                   | Interaction avec RE   |
|-------------------------------------|--------------------|--|-------------------------------------|---|
| Coactivateurs du domaine AF2        | SRC1 (p160)        | Steroid Receptor Coactivator 1                         | HAT                                 | Lient le domaine AF2 du RE via des motifs LXXLL                             |
|                                     | SRC2 (p160)        | Steroid Receptor Coactivator 2                         | HAT                                 |   |
|                                     | SRC3 (p160)        | Steroid Receptor Coactivator 3                         | HAT                                 |   |
|                                     | CBP/p300           | CREB-binding protein                                   | HAT                                 |   |
|                                     | TRAP220, TRAP/DRIP | Thyroid hormone receptor activating protein of 220 kDa |                                     |   |
|                                     | ASC1               | Activating Signal Cointegrator 1                       | Lient des HATs et des NRs           |   |
|                                     | ASC2               | Activating Signal Cointegrator 1                       |                                     |   |
| Coactivateurs du domaine AF1        | SRA                | Steroid Receptor Activator                             | Epissage                            | Lient le domaine AF1 du RE  |
|                                     | p68                | p68 RNA helicase                                       | RNA helicase                        |   |
| Coactivateurs secondaires           | CARM1              | Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1    | Arginine histone methyl transferase | Lient indirectement le domaine AF2 du RE via leur association avec les p160 |
|                                     | PRMT1              | Protein methyltransferase 1                            | Arginine histone methyl transferase |   |
|                                     | CoCoA              | Coiled-coil coactivator                                |                                     |   |
| Coactivateurs à plusieurs fonctions | E6-AP              | E6- associated protein                                 | Ubiquitine ligase                   | Lient le domaine AF2 du RE  |
|                                     | RPF1               | Receptor potentiating factor 1                         | Ubiquitine ligase                   |   |
|                                     | PGC1 $\alpha$      | PPAR $\gamma$ coactivator1                             |                                     | Lient la région charnière du RE   |
|                                     | PGC1 $\beta$       |  |                                     |   |
|                                     | CAPER-alpha        | Coactivator of AP1 and Estrogen Receptor               | Potentialisent l'activité du RE     | S'associent indirectement avec le RE via leur liaison avec ASC2             |
|                                     | CAPER-beta         |  |                                     |   |

Table 2 : *Les coactivateurs du RE* – Liste des abréviations ; HAT : Histone Acétyl Transférase, NR : Récepteur Nucléaire, AF : Activation Fonction

le RE $\alpha$  et qu'il potentialisait son activité transcriptionnelle de manière ligand dépendante (Onate et al., 1995). De plus la surexpression de SRC1 est capable d'annuler l'effet de squelching causé par la surexpression de RE $\alpha$  sur l'activité transcriptionnelle du récepteur de la progestérone (PR). Cela suggère que SRC1 fait partie de ces facteurs, présents en quantité limitante, qui modulent l'activité des récepteurs nucléaires (RN) (Onate et al., 1995). Le clonage de SRC1 a ensuite permis de découvrir une famille de co-activateurs ayant des homologies structurelles et fonctionnelles avec SRC1. Cette famille a été appelée famille des p160 et est composée de trois membres : SRC1 (ou NCoA1), SRC2 (ou GRIP1, TIF2, NCoA2) et SRC3 (ou AIB1, ACTR, p/CIP, RAC3, TRAM1, NCoA3) (Anzick et al., 1997; Chen et al., 1997; Hong et al., 1997; Kamei et al., 1996; Li et al., 1997; Onate et al., 1995; Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1996). Ces co-activateurs ont une activité histone acétyltransférase (HAT) qui permet un remodelage plus aisé de la chromatine des gènes cibles (McDonnell and Norris, 2002).

#### c/ Interaction entre RE $\alpha$ et p160

Le domaine LBD du RE $\alpha$  est formé de douze hélices  $\alpha$  (H1 à H12). En présence d'agonistes du RE $\alpha$  l'hélice 12 se replie sur les hélices 3,5/6 et 11 créant ainsi une nouvelle surface d'interaction pour les co-facteurs du RE $\alpha$  (Feng et al., 1998). La cristallisation du domaine LBD du RE $\alpha$  avec un peptide correspondant à la région d'interaction de SRC2 avec les récepteurs nucléaires indique que les co-activateurs lient le RE $\alpha$  au niveau d'un sillon hydrophobe qui apparaît suite au repositionnement de l'hélice 12. Pour le RE $\alpha$  lié à un antagoniste, l'hélice 12 occupe la surface d'interaction des co-activateurs, mimant leur interaction avec le RE $\alpha$  et donc leur recrutement (Shiau et al., 1998).

Parallèlement à ces études, la région d'interaction des co-activateurs avec les récepteurs nucléaires a été caractérisée. Heeny et ses collaborateurs ont identifié dans les co-

activateurs un domaine, appelé LXXLL (L pour Leucine et X pour un acide aminé quelconque) qui est nécessaire et suffisant pour la liaison entre co-activateurs et récepteurs nucléaires (Heery et al., 1997). Il existe trois motifs LXXLL conservés au sein de la famille des p160s et d'autres motifs LXXLL sont trouvés dans d'autres co-activateurs comme TRAP 220, CBP, p300 ainsi que ASC1 et ASC2 (Activating Signal Cointegrator 1 et 2, cf table 2) etc... Le fait que l'interaction entre le RE $\alpha$  et ses co-activateurs se fasse par un motif de seulement cinq acides aminés (motif LXXLL) pose la question de la spécificité ou du choix d'interaction entre le RE $\alpha$  et ses différents partenaires. Des études ultérieures ont montré que les séquences flanquantes sont des déterminants clé pour l'affinité et la spécificité d'interaction entre co-activateurs et récepteurs nucléaires (Chang et al., 1999; McInerney et al., 1998a). De plus de multiples motifs LXXLL au sein d'un même co-activateur contribuent à la sélectivité d'interaction avec ses partenaires. Par exemple pour SRC1 un seul motif LXXLL est suffisant pour son interaction avec le RE $\alpha$  tandis qu'il en faut deux pour son interaction avec le récepteur de l'hormone thyroïde ou avec le récepteur de l'acide rétinoïque (McInerney et al., 1998a).

#### d/ Les co-activateurs spécifiques du domaine AF1

En plus du large éventail de co-activateurs interagissant avec le domaine AF2 du LBD du RE $\alpha$ , il existe d'autres co-activateurs capables d'interagir avec sa région AF1 (cf. table 2). Il existe en particulier un ARN, SRA pour Steroid Receptor co-Activator, qui augmente l'activité AF1 du récepteur des oestrogènes et des autres récepteurs nucléaires (Lanz et al., 1999). Un autre co-activateur spécifique de la région AF1 est la p68 RNA hélicase qui potentialise l'activité du RE $\alpha$  lié aux oestrogènes ou aux anti-oestrogènes (Endoh et al., 1999). Il est intéressant d'ajouter que ce co-activateur n'est pas capable d'augmenter l'activité

transcriptionnelle du RE $\beta$ , ce qui est probablement dû à l'absence d'un domaine AF1 fonctionnel.

#### e/ Les co-activateurs indirects du RE $\alpha$

La liaison du RE $\alpha$  avec ses co-activateurs par les domaines AF1/AF2 permet ensuite le recrutement d'autres acteurs de la transcription. Par exemple les co-activateurs p160s ne contiennent pas seulement des motifs LXXLL mais aussi un domaine d'activation de la transcription C-terminal (contenant les motifs AD1 et AD2) et un domaine N-terminal possédant le motif bHLH/PAS (basic Helix Loop Helix/PAS). Ces deux domaines sont capables de s'associer avec des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine. AD1 recrute les histones acétyltransférases CBP et p300 et AD2 interagit avec des arginines méthyl transférases (appelées PRMTs pour Protein Arginine Methyl Transferases) comme CARM1 (Co-activator Associated arginine Methyl Transferase 1). Le recrutement indirect de ces facteurs permet de relayer le message initié par le RE $\alpha$ . Par exemple SRC1 par son interaction avec CBP et SRC2 par son interaction avec des PRMTs fonctionnent de manière synergique pour potentialiser l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  (Stallcup et al., 2000). De plus il a été récemment décrit un nouveau co-facteur du RE $\alpha$ , CoCoA (Coiled Coil co-Activator) qui lie le domaine bHLH/PAS des p160s et stimule la transcription des gènes cible du RE $\alpha$  (Kim et al., 2003).

#### f/ Les co-répresseurs du RE $\alpha$

##### *Les co-répresseurs physiologiques*

Le fait que tous les ligands naturels du RE $\alpha$  soient des agonistes suggère que le rôle essentiel de ce facteur de transcription est de stimuler la transcription de ces gènes cibles. Ainsi l'existence de co-activateurs qui amplifient l'activité du RE $\alpha$  est raisonnable. Toutefois le taux physiologique d'oestradiol circulant est assez fluctuant (cf. table 3 pour une vue de la



Concentration en oestrogènes

---

| <i>dans le sérum</i>   | <u>Condition physiologique / pathologique</u>                                      |
|------------------------|--|
| < 0,28nM               | phase folliculaire   cycle<br>phase lutéale   menstruel                            |
| < 1,1nM                |  |
| < 150nM                | grossesse  |
| 0,114nM / 0,093nM      | cancer du sein / controle<br>mesures réalisées chez des<br>femmes post ménopausées |
| <i>dans les tissus</i> | <u>Localisation</u>  |
| 1,29nM                 | tumeur mammaire  |
| 0,76nM                 | tissus sains adjacent (tissus épithélial, adipeux)                                 |

Table 3 : *Concentration en œstradiol selon différentes situations physiologiques ou pathologiques*

variation du taux d'oestrogènes selon les étapes de la vie d'une femme) et dans certains tissus comme les ovaires le taux d'oestrogènes est constamment élevé ce qui pourrait conduire à une activation constitutive du RE $\alpha$ . Il a été identifié des co-répresseurs du RE $\alpha$  capable d'atténuer son activité transcriptionnelle. Un co-répresseur récemment décrit nommé REA (Repressor of Estrogen Receptor Activity) dont l'interaction avec le RE entraîne une diminution de son activité (Delage-Mourroux et al., 2000). Un autre co-répresseur, RIP 140, ayant des motifs LXXLL, s'associe au RE $\alpha$  lié à l'oestradiol au niveau de la région AF2 et empêche ainsi l'accès aux co-activateurs interagissant avec cette région du RE $\alpha$ . De plus RIP140 peut réduire l'activité transcriptionnelle basale du RE $\alpha$  en s'associant à des complexes à activité histone déacétylase (HDAC) qui répriment la transcription en catalysant la condensation de la chromatine (Castet et al., 2004; Wei et al., 2000). Ainsi l'existence de ces co-répresseurs, capables de moduler l'activité du RE $\alpha$  lié à des agonistes, montre qu'il existe un mécanisme supplémentaire pour la régulation fine de l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$ .

#### *Les co-répresseurs du RE $\alpha$ lié aux anti-oestrogènes*

Les premiers co-répresseurs des récepteurs nucléaires identifiés et certainement les plus étudiés sont NCoR (Nuclear CoRepressor) et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor) (cf. table 4). L'interaction de ces deux co-répresseurs avec le RE est purement limitée à un contexte pharmacologique. Il a été montré que l'hydroxy-Tamoxifène (OH-TAM) et le Raloxifène sont capables d'induire le recrutement de NCoR et SMRT sur le promoteur de certains gènes cibles du RE $\alpha$  (Shang and Brown, 2002; Shang et al., 2000). L'interaction entre le RE $\alpha$  et ses co-répresseurs (N-CoR ou SMRT) n'est pas encore extrêmement bien connue mais il a été démontré que NCoR et SMRT possédaient des motifs protéiques appelés boîtes CoRNR, dont le motif est proche des séquences LXXLL, permettant la liaison des co-répresseurs au RE $\alpha$ , en présence d'OH-TAM (Huang et al.,

| CoFacteur     | Nom complet  | Fonction/activité  | Interaction avec RE                             |
|---------------|--|--|---|
| NCoR          | Nuclear receptor corepressor                             | HDAC   | Lient le domaine AF2 du RE grâce au motif CoRNR |
| SMRT          | Silencing mediator for retinoïd and thyroïd receptors    | HDAC   |   |
| RIP140 (NRIP) | Receptor interacting protein of 140 kD                   | Entre en compétition avec les coactivateurs pour la liaison au domaine AF2 du RE, s'associe avec des HDACs | Lie le domaine AF2 du RE via des motifs LXXLL   |
| REA           | Repressor of estrogen receptor activity                  | Interfère avec SRC1 pour la liaison au RE  | Liaison indirecte                               |
| RTA           | Repressor of tamoxifen transcriptional activity          | Interfère avec SRC1 pour la liaison au RE, activité de liaison à l'ARN                                     | Lie le domaine AF1 du RE                        |
| mSiah2        | Mammalian homolog of drosophila Seven in absentia (sina) | Réprime l'activité des NR en adressant NCoR au protéasome  | Lie le RE indirectement via NCoR                |

Table 4 : *Les corépresseurs du RE* – Liste des abréviations ; HDAC : Histone DéACétylases, NR : Récepteurs nucléaires, AF : Activation Fonction

Source: Hall, J et al. Molecular interventions, décembre 2005, volume 6, pages 343-357

2002). De plus la présence des hélices  $\alpha$  3 et 5 du LBD du RE $\alpha$  sont cruciales pour cette interaction (Huang et al., 2002). Des expériences de transfection transitoire de N-CoR et de SMRT ont montré que ces protéines étaient capables de supprimer l'activité agoniste du Tamoxifène (Jackson et al., 1997). Il a ensuite été montré que l'injection d'anticorps contre les protéines NCoR ou SMRT permettait d'intensifier l'activité agoniste du Tamoxifène (Lavinsky et al., 1998). De la même manière dans des fibroblastes de souris KO pour NCoR, le Tamoxifène devient un puissant agoniste du RE $\alpha$  (Jepsen et al., 2000). L'ensemble de ces résultats montrent que NCoR et SMRT ont peu d'impact sur le RE $\alpha$  lié à l'oestradiol en revanche ils sont capables de supprimer efficacement l'activité agoniste des antagonistes partiels du RE $\alpha$  tels que le Tamoxifène ou le Raloxifène.

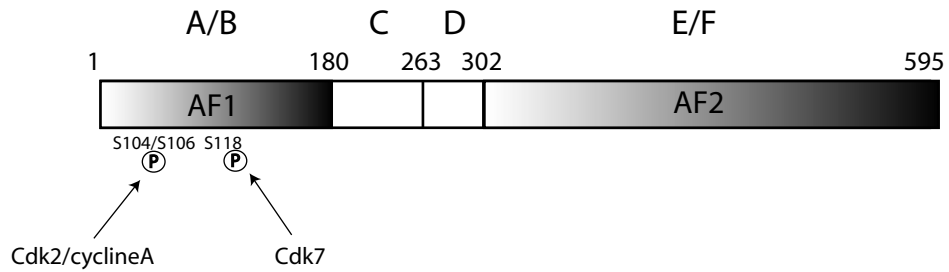
En résumé on peut dire que l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  est régulée par un vaste éventail de cofacteurs dont les principaux ont été décrits ci-dessus (cf. table 2 et table 4 ainsi que (McDonnell and Norris, 2002; McKenna et al., 1999; McKenna and O'Malley, 2002; Smith and O'Malley, 2004)). C'est ce réseau complexe de co-activateurs et de co-répresseurs qui permet une régulation fine de l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  et notamment explique en partie l'activité plus ou moins forte du RE selon le type cellulaire ainsi que la balance entre activité agoniste/antagoniste des SERMs selon les tissus.

En plus de ce mécanisme fin de régulation du RE $\alpha$ , il existe un niveau de complexité supérieur de contrôle de l'activité du RE $\alpha$ . En effet au sein d'un même type cellulaire, le dialogue entre les voies de signalisation ainsi que les modifications post-traductionnelles du RE $\alpha$  et de ses partenaires vont jouer un rôle important dans son activité.

### 3/ Impact des voies de signalisation sur l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$

#### a/ Les Sites de phosphorylation du RE $\alpha$

Les sites phosphorylés après liaison à l'oestradiol



Les sites phosphorylés suite à l'activation des voies de transduction du signal

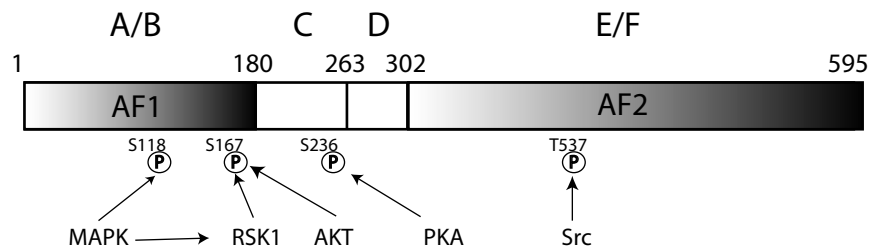


Figure 7 : Les sites de phosphorylation du REα

Les sites majeurs de phosphorylation du RE $\alpha$  se trouvent dans le domaine AF-1 situé dans la partie N-terminale de la protéine (figure 7). Les sérines 104 et 106 sont phosphorylées par le complexe Cdk2/cycline A (Rogatsky et al., 1999). La sérine 118 est phosphorylée en réponse aux oestrogènes (Joel et al., 1995) par la sous unité cdk7 du complexe TFIIH (Chen et al., 2000). La sérine 118 peut aussi être phosphorylée de manière ligand indépendante par les MAP kinases (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). La sérine 167 est phosphorylée par RSK1, une kinase qui se trouve en aval de la signalisation par les MAPKs (Joel et al., 1998). Cette sérine peut être également phosphorylée par AKT (Campbell et al., 2001). La sérine 236, située dans le domaine de liaison à l'ADN, est phosphorylée par la PKA (Chen et al., 1999). Finalement la région E du RE $\alpha$  peut être phosphorylée sur la tyrosine 537 par les tyrosines kinases de la famille Src (Arnold et al., 1995; Migliaccio et al., 1993).

#### b/ Impact de la phosphorylation du RE $\alpha$ sur son activité transcriptionnelle

Dans la majeure partie des cas la phosphorylation du RE $\alpha$  a un effet positif sur l'activité transcriptionnelle. La phosphorylation du domaine A/B par les MAPKs (ERKs, p38MAPK, JNKs) ou la famille AKT facilitent le recrutement de co-activateurs tels que SRC1 ou p68 (Endoh et al., 1999; Tremblay et al., 1999). De plus la génération de lignée de cellules MCF7 exprimant un mutant de la kinase MEK1 (famille des MAPKs) ayant une activité constitutive montre que dans cette lignée le RE $\alpha$  devient hypersensible à l'oestradiol (il est activé à des doses de  $10^{-10}$  M d'E2, alors que le RE $\alpha$  est activable à des doses de  $10^{-9}$  M d'E2 en temps normal). De plus l'activité constitutive de MEK1 entraîne une meilleure affinité entre le RE $\alpha$  et SRC2/SRC3 (Atanaskova et al., 2002).

Il a aussi été montré que le RE $\alpha$  pouvait interagir avec TFIIH de manière ligand dépendante (Chen et al., 2000). TFIIH est un complexe multiprotéique impliqué dans l'activation transcriptionnelle et le système NER (Nucléotide Excision Repair) (Egly, 2001).

Le complexe TFIID est composé de plusieurs sous unités dont la kinase cdk7. L'interaction du RE $\alpha$  avec le complexe TFIID entraîne la phosphorylation de sa région A/B par la cdk7 (Chen et al., 2000). De plus l'hélice 12 du RE $\alpha$  (impliquée dans le recrutement ligand dépendant des co-activateurs) est essentielle pour la phosphorylation du RE $\alpha$  par cdk7, ce qui explique l'importance du ligand dans ce processus (Chen et al., 2000).

L'ensemble des phosphorylations du domaine AF1 permet de faciliter le recrutement de complexes de modification et de remodelage de la chromatine qui permettent une ouverture de la chromatine et finalement le recrutement de la machinerie de transcription.

Le domaine AF2 est aussi la cible de kinases. Les Src kinases sont capables de phosphoryler le RE $\alpha$  sur la tyrosine 357 qui est un résidu proche de l'hélice 12. Cette phosphorylation régule, probablement par un changement de conformation, la liaison du RE $\alpha$  à l'oestradiol, sa dimérisation (Arnold et al., 1997; Migliaccio et al., 1989) et /ou le recrutement de co-facteurs.

Le RE $\alpha$  non ligandé peut aussi être régulé négativement par la PKA. Elle peut phosphoryler le RE $\alpha$  sur la sérine 236 et cette phosphorylation empêche la dimérisation du RE $\alpha$  (Chen et al., 1999).

#### *c/ Impact des voies de signalisations sur les co-régulateurs du RE $\alpha$*

Un grand nombre de partenaires direct du RE $\alpha$  tel que SRC-1 (Rowan et al., 2000), SRC-2 (Lopez et al., 2001), PGC-1 (Knutti et al., 2001), SRC-3 (Font de Mora and Brown, 2000) et p300/CBP (Vo and Goodman, 2001; Yuan and Gambia, 2000) sont des cibles de kinases comme les MAPKs, la PKA ou d'autres kinases. Ces phosphorylations ont pour effet d'augmenter la liaison ligand dépendante de ces co-régulateurs avec le RE $\alpha$ , de recruter plus efficacement des complexes à activité HAT et ainsi de permettre une meilleure accessibilité des promoteurs cible.

Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation ont été particulièrement bien étudiées. Ces études ont montré que la phosphorylation de SRC-3 par la voie des MAPKs (ERK1, MEK1) est associée à une activité transcriptionnelle plus forte et une meilleure liaison avec p300 (Lopez et al., 2001). Le traitement par le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) entraîne la phosphorylation de SRC-3 et un déplacement de cette protéine du cytoplasme vers le noyau (Wu et al., 2002), ce qui indique que la phosphorylation peut aussi influencer la localisation cellulaire de certains partenaires du RE $\alpha$ . Enfin, une étude extrêmement intéressante de Wu et ses collaborateurs réalisée en 2004 montre qu'il existe six sites de phosphorylation sur SRC-3. Ces sites sont différenciellement phosphorylés par plusieurs kinases (p38, JNK, ERK, GSK3, CK1, IKKs) et la combinatoire de ces phosphorylations permet à SRC-3 d'assurer différentes fonctions physiologiques (Wu et al., 2004).

Les voies de transduction du signal peuvent aussi cibler les co-répresseurs du RE $\alpha$ . SMRT (un répresseur transcriptionnel du RE $\alpha$ ) est phosphorylé suite à l'activation de MEKK1 ou MEK1 et cela entraîne son incapacité à se lier avec ses partenaires transcriptionnels (comme RE $\alpha$ ) et son export vers la cytoplasme (Hong and Privalsky, 2000). D'autres répresseurs comme N-CoR ou RIP140 ont leur localisation cellulaire régulée par des voies de transduction du signal (Espinosa et al., 2003; Zilliacus et al., 2001) ce qui permet une meilleure activation des gènes oestrogénorégulés.

#### d/ Les autres modifications post traductionnelles du RE $\alpha$

Le RE $\alpha$ , en tant que facteur de transcription, se situe au sein de complexes dont certaines sous-unités ont une activité acétyltransférase (tels que les SRC, CBP/P300, CARM1...). Wang et ses collaborateurs ont mis en évidence que certains résidus lysines de RE $\alpha$  étaient acétylés par p300 (Wang et al., 2001a). Toutefois les conséquences fonctionnelles de cette acétylation sur l'activité du RE $\alpha$  ne sont pas claires. Ce n'est que très récemment



qu'il a été montré que l'acétylation du RE $\alpha$  était dépendante du ligand ainsi que des p160. Les résidus lysine 266 et 268 ont été identifiés comme les cibles de p300. L'acétylation de ces résidus favorise la liaison du RE $\alpha$  à l'ADN et son activité transcriptionnelle ligand dépendante (Kim et al., 2006). Le RE $\alpha$  peut aussi être sumoylé, de manière ligand dépendante, par SUMO-1 au niveau de sa région charnière et cette sumoylation joue un rôle sur la modulation de l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  (Sentis et al., 2005). Enfin le RE $\alpha$  peut aussi être ubiquitinylé et cela de manière ligand dépendante (Nirmala and Thampan, 1995). Cette polyubiquitinylation du RE $\alpha$  favorise sa dégradation par la voie du protéasome (Nawaz et al., 1999) et joue aussi un rôle important dans la régulation de l'activité du RE $\alpha$  (Reid et al., 2003).

De plus les partenaires du RE $\alpha$  sont aussi la cible de diverses enzymes de modification et qui influencent leur activité, ajoutant un niveau de complexité supérieur à la régulation de la transcription par le récepteur des oestrogènes.

## **D/ La voie de signalisation IGF-I**

### 1/ Rôle physiologique et physiopathologie de l'IGF-I

#### a/ L'IGF-I dans le développement normal de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire peut se diviser en sept étapes (pour une revue (Laban et al., 2003)). Les hormones de croissance ainsi que l'IGF-I sont essentiels pour chacune de ces étapes. De plus l'IGF-I est essentiel pour la morphogenèse des canaux mammaires, en son absence la glande mammaire ne se développe pas, même en présence d'oestrogènes (Ruan and Kleinberg, 1999). L'IGF-I joue aussi un rôle dans la physiologie de la glande mammaire adulte pendant la lactation. Des souris transgéniques allaitant qui sur

expriment le produit du gène *Igf1* (codant le peptide IGF-I) souffrent d'hypertrophie des canaux mammaires (Hadsell et al., 1996).

#### b/ Effets de l'IGF-I sur le reste de l'organisme

La voie de signalisation IGF joue un rôle central dans le développement et la croissance de nombreux tissus et régule en particulier la taille et la croissance d'un organisme. Cette voie de signalisation est complexe et se compose de plusieurs éléments : les ligands (IGF-I et IGF-II), les récepteurs de ces ligands (IGF-IR, IGF-IIR et le récepteur à l'insuline IR) et la famille des 'IGF Binding Proteins' (IGFBPs).

#### c/ IGF-I et cancer du sein

Il a été montré que la concentration d'IGF-I circulante est élevée dans de nombreuses tumeurs mammaires (Peyrat et al., 1993). Ces niveaux élevés ne sont probablement pas dus à la tumeur elle-même puisque d'autres études ont prouvé qu'un niveau élevé d'IGF-I circulant augmentait le risque de développer un cancer du sein, que ce soit chez les femmes pré ou post ménopausées (Hankinson et al., 1998; Kaaks et al., 2002). In vivo, l'utilisation d'anticorps dirigés contre le récepteur de l'IGF-I réduit la taille de tumeurs mammaires transplantées à des souris nude (Arteaga et al., 1989). L'ensemble de ces travaux et de nombreux autres démontrent donc que le système IGF-I a une incidence sur le développement de tumeurs mammaires, notamment en favorisant la prolifération et la survie cellulaire.

## 2/ La cascade de signalisation IGF-I : du facteur de croissance au noyau

### a/ Du peptide à la membrane cytoplasmique

#### *Les ligands IGF*

Les IGFs sont une famille d'hormones peptidiques possédant des homologies structurales avec l'insuline (Rinderknecht and Humbel, 1976a, b). Les IGFs ont été découvertes au cours la recherche de facteurs intervenant dans l'effet proliférateur des hormones de croissance (Salmon and Daughaday, 1957). Des recherches ultérieures ont révélé qu'il existe deux IGF, IGF-I (70 acides aminés, gène localisé sur le chromosome 12, en position 12q22-q23) et IGF-II (67 acides aminés, gène localisé sur le chromosome 11, en position 11q15.5) (Rinderknecht and Humbel, 1978a, b).

### *Expression de IGF-I et IGF-II*

Chez les rongeurs le peptide IGF-II est exprimé de façon ubiquitaire dans l'embryon et son taux d'expression diminue de manière drastique après la naissance. En revanche l'expression du peptide IGF-I est très faible durant le stade embryonnaire, augmente significativement durant la puberté et reste élevé chez la souris adulte. Chez l'adulte, les hépatocytes sont la principale source d'IGFs circulant mais ils existe aussi des lieux de production ectopique d'IGF comme les fibroblastes, les chondrocytes, les osteoblastes et les cellules épithéliales (Adashi et al., 1985; D'Ercole et al., 1984; Han et al., 1987). Ce schéma d'expression des peptides IGF chez les rongeurs a initialement mené à l'hypothèse que IGF-II est un facteur de croissance requis pour le développement embryonnaire tandis que IGF-I est un facteur de croissance requis pour certaines fonctions de l'âge adulte. Toutefois ce patron d'expression n'est pas identique chez l'homme : IGF-I et IGF-II sont exprimés dans de nombreux tissus humains tout au long de la vie. Cependant, l'IGF-II n'est pas exprimé dans le tissu mammaire sain et son rôle dans le développement normal de la glande mammaire est mal défini (Paik, 1992). En revanche de nombreuses études ont montré que IGF-I et IGF-II stimulent la croissance des cellules cancéreuses mammaires (Bartucci et al., 2001; Dufourny et al., 2000; Musgrove and Sutherland, 1993; Osborne et al., 1990; van der Burg et al., 1988).

### *Les récepteurs IGF*

Les IGFs se lient à des récepteurs associés à la membrane cytoplasmique, ce qui a comme conséquence d'activer la transduction d'un grand nombre de signaux cytoplasmiques impliqués dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose.

Deux types de récepteurs à l'IGF ont été décrits. Le récepteur à l'IGF de type II (IGF-RII) lie exclusivement IGF-II. Ce récepteur est quasiment identique au récepteur au mannose 6 phosphate, c'est une protéine de 300kD avec un vaste domaine extracellulaire et un petit domaine intracellulaire. L'IGF-RII n'a pas d'activité tyrosine kinase et sa capacité à transmettre le message de l'IGF n'est pas claire (pour une revue (Sachdev and Yee, 2001)). Il a été émis l'hypothèse que le rôle de ce récepteur est de titrer IGF-II, l'empêchant ainsi d'interagir avec l'IGF-RI (Ellis et al., 1996).

Le récepteur de l'IGF de type I (IGF-RI) peut quant à lui lier IGF-I et IGF-II, bien qu'il interagisse préférentiellement avec IGF-I. La plupart des effets physiologiques des IGF sont assurés par le récepteur de type I (LeRoith et al., 1995). Le IGF-RI est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme excepté dans les hépatocytes et les lymphocytes T où il n'est pas exprimé (Baserga, 1998; Werner et al., 1991).

### *Les IGFBPs*

Les IGFBPs (pour IGF Binding Proteins) sont les principaux transporteurs des IGFs dans la circulation sanguine. La fonction des IGFBPs est de réguler la liaison ligand récepteur du système IGF. La famille des IGFBPs comporte six protéines qui ont une forte affinité pour les hormones peptidiques IGFs. La liaison de l'IGF aux IGFBPs inhibe sa fixation à son récepteur cible (IGF-RI) et bloque l'effet prolifératif de l'IGF. Les IGFBPs régulent également la biodisponibilité des IGFs en maintenant un réservoir important d'IGFs circulant

et en prolongeant leur demi-vie. De plus en plus de travaux montrent que en plus de leurs effets régulateurs sur la voie de signalisation IGF, les IGFBPs ont aussi une activité indépendante de la voie IGF. Toutefois la façon dont ces effets sont relayés dans la cellule restent obscurs bien qu'il a été décrit un récepteur putatif aux IGFBPs 3 et 5 (pour une revue (Hwa et al., 1999)). De nombreux travaux suggèrent que les IGFBPs sont impliquées dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'apoptose (pour une revue (Perks and Holly, 2000)). L'expression des IGFBPs est régulée au niveau transcriptionnel par les hormones stéroïdes, les facteurs de croissance et les cytokines. Des modifications post traductionnelles comme des phosphorylations, des glycosylations et des clivages protéolytiques sont impliqués dans la régulation de la fonction des IGFBPs (pour une revue (Clemmons, 1997)).

#### *Structure et Activation de l'IGF-RI*

Le IGF-RI est le produit d'un seul gène, il est transcrit sous forme de précurseur et est traduit en 2 sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Ullrich et al., 1986). Le récepteur fonctionnel se présente sous forme d'un hétérotétramère composé de deux sous unités  $\alpha$  et de deux sous unités  $\beta$  qui sont liées par deux ponts di-sulfures. Les sous unités  $\alpha$  sont extracellulaires et forment le site de liaison à l'IGF. Les sous unités  $\beta$  qui contiennent une partie extracellulaire et transmembranaire et un large domaine cytoplasmique qui transmet le signal induit par le ligand. La liaison du ligand sur l'IGF-RI entraîne un changement de conformation, une oligomérisation du récepteur, une auto phosphorylation des résidus tyrosines dans la partie  $\beta$  intracellulaire du récepteur et l'activation des molécules de signalisation qui se trouvent en aval du récepteur. Les sous-unités  $\beta$  du IGF-RI sont capables de lier plusieurs protéines dites 'adaptrices' comme IRS-1 et Shc. La liaison de ces molécules permet la formation d'une plateforme d'interaction ou un grand nombre de molécules impliquées dans la transduction du

signal seront phosphorylées (pour une revue (Surmacz et al., 1998) et cf figure 8 pour une vue générale de la voie de transduction du signal IGF-I).

#### b/ De la membrane cytoplasmique au cytoplasme

Une fois oligomérisé et actif, le IGF-RI est capable d'interagir avec un grand nombre de substrats intracellulaires qui seront les cibles de son activité tyrosine kinase. Les substrats les mieux décrits sont Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) (Myers et al., 1994), IRS-2 (He et al., 1996), src-homology 2/collagen alpha proteins (Shc) (Giorgetti et al., 1994; Pelicci et al., 1992), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) (Lamothe et al., 1995), growth factor receptor binding protein 10 (Grb10) (Morrione et al., 1996). Les mieux caractérisés de ces partenaires sont IRS-1 et Shc. Chacun de ces deux substrats est rapidement phosphorylé sur ses résidus tyrosine par l'IGF-RI activé. Ces phosphorylations leur permettent d'interagir avec des protéines contenant un domaine SH2. Par exemple IRS-1 active la PI-3K grâce à son association avec la sous unité p85 de la PI3K, au niveau de son domaine SH2. IRS-1 active aussi la voie Ras/MAPKs par l'intermédiaire des protéines Grb-2 et SOS (Giorgetti et al., 1994; Pelicci et al., 1992). IRS-1 est aussi capable d'activer d'autres voies de signalisation plus obscures qui impliquent les adaptateurs Nick et Crk (Beitner-Johnson et al., 1996; Myers et al., 1994). Beaucoup d'éléments de la voie de signalisation IGF-I sont partagés avec d'autres systèmes de transduction du signal. Par exemple IRS-1 est activé par le récepteur à l'insuline ainsi que par d'autres récepteurs qui n'ont pas d'activité tyrosine kinase (via par exemple la Janus-type Kinase (Argetsinger et al., 1995; Myers et al., 1994)). Shc est aussi un substrat pour de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase, des tyrosines kinases cytoplasmiques et certaines phosphatases (Giorgetti et al., 1994; Habib et al., 1994; Pelicci et al., 1992; Pelicci et al., 1995). Ainsi la réponse à l'IGF-I ne dépend pas seulement de la

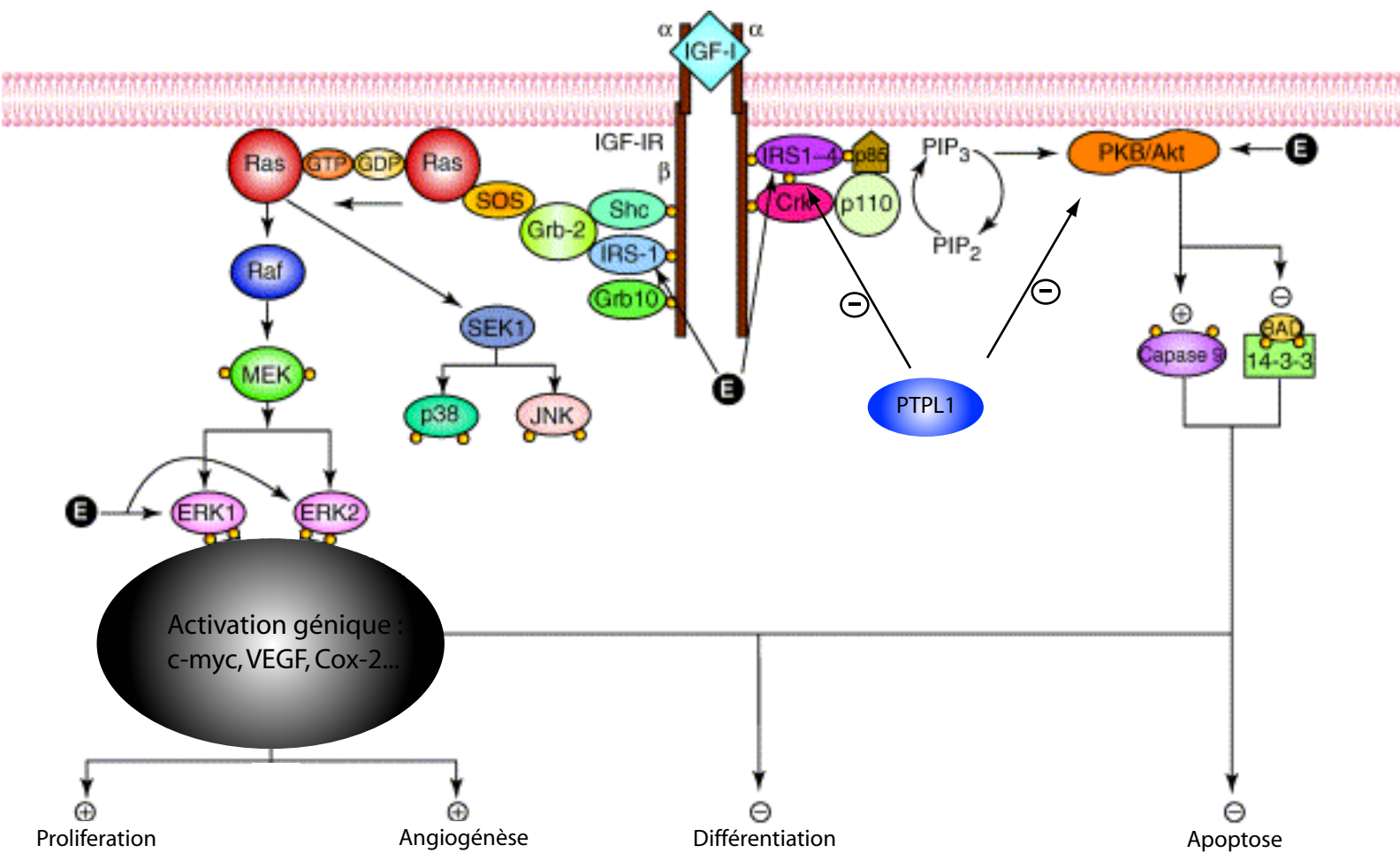


Figure 8 : La voie de signalisation IGF-1 et ses régulations

Source : Laban et al, Trends Endocrinol Metab, janvier 2003, volume 14, pages 28-34

présence ou non du IGF-RI mais aussi du contexte cellulaire qui peut varier grandement selon les autres stimuli extracellulaires.

### *La voie PI-3 kinase/AKT*

Les PI3K sont des hétérodimères formés d'une sous unité catalytique (p110) et d'une sous unité régulatrice (p85). La sous-unité régulatrice p85 est une phosphoprotéine substrat des récepteurs à activité tyrosine kinase tel que le IGF-RI. Le recrutement de la sous unité p85 par IRS-1 au niveau du IGF-RI va entraîner sa phosphorylation et va conduire à l'activation de la PI3K de deux manières. Tout d'abord cette phosphorylation va lever l'effet inhibiteur de la p85 sur la sous-unité catalytique p110 (Yu et al., 1998). De plus, la relocalisation de la PI3K, qui est une protéine cytoplasmique, au niveau de la membrane cytoplasmique, rapproche la sous unité catalytique p110 de son substrat. En effet, la sous-unité p110 de la PI3K est capable de phosphoryler des lipides présents au niveau de la membrane cytoplasmique portant des groupes inositols. Ces lipides, appelés phosphatidylinositols, sont phosphorylés par la PI3K au niveau de leur position 3' pour donner une molécule appelée PIP2. Cette molécule est ensuite convertie en PIP3. Cette dernière molécule est un second messenger cellulaire, elle va déclencher l'activation d'un grand nombre de voies de transduction du signal. Le PIP3 peut recruter au niveau de la membrane toute protéine contenant un domaine homologue à la pleckstrine (domaine PH). Une des cibles majoritaires du PIP3 est la famille des serine/threonine kinases AKT (AKT1, AKT2, AKT3, cette famille de kinase est aussi appelée PKB) qui peuvent interagir avec le PIP3 grâce à leur domaine PH. La famille AKT est un des relais majeur du message transmis par la PI3K, bien que cette kinase puisse exercer des actions en dehors de AKT, notamment au niveau de la SGK (Serum and Glucocorticoid-inducible Kinase), de CDC 42 et de RAC 1 qui appartiennent à la famille des petites protéines capable de fixer le GTP (pour une revue (Vivanco and Sawyers, 2002)).



La famille des kinases AKTs est composée de trois membres : AKT1, AKT2 et AKT3. Ces kinases sont assez largement exprimées dans l'organisme bien qu'il y ait des différences d'expression spécifiques à certaines isoformes. L'activation d'AKT se fait en deux étapes : dans un premier temps elle est recrutée au niveau de la membrane plasmique (via son interaction avec le PIP3) puis elle est phosphorylée, dans le cas d'AKT1, au niveau de ces résidus Thr308 et Ser473 (Andjelkovic et al., 1997; Bellacosa et al., 1998). La phosphorylation de la thréonine 308 est catalysée par une autre protéine à domaine PH, la 3-phosphoinositide –dependant protein kinase 1 (PDK1) (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). La phosphorylation de ce résidu thréonine est nécessaire et suffisant pour l'activation d'AKT (Stokoe et al., 1997). Toutefois la phosphorylation du résidu sérine 473 par la PDK2 permet une activation optimum d'AKT (Alessi et al., 1997).

Les conséquences biologiques de l'activation de la kinase se classent en trois catégories : survie cellulaire, prolifération (augmentation du nombre de cellules) et croissance cellulaire (augmentation de la taille des cellules).

***Survie cellulaire*** – La famille AKT est capable de phosphoryler directement plusieurs composants de la machinerie de mort cellulaire. BAD forme un hétérodimère avec le facteur de survie BCL-X1 et bloque son activité. La phosphorylation de BAD par AKT empêche cette interaction (Datta et al., 1997) rétablissant ainsi la fonction anti-apoptotique de BCL-X1. AKT inhibe aussi l'activation de la caspase 9, un facteur de mort cellulaire, par sa phosphorylation (Cardone et al., 1998). De plus la phosphorylation de FKHR, un membre de la famille des facteurs de transcription Forkhead, par AKT empêche la translocation nucléaire de ce facteur de transcription (Brunet et al., 1999) et donc l'activation de ses gènes cibles qui incluent plusieurs agents pro-apoptotiques tels que les protéines BIM ou FAS ligand. AKT peut aussi influencer la survie cellulaire indirectement en régulant l'activité de deux facteurs

majeurs impliqués dans l'apoptose : NF- $\kappa$ B et p53. NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription qui favorise la survie cellulaire, AKT régule positivement l'activité de NF- $\kappa$ B en activant par phosphorylation la kinase IKK qui phosphoryle I $\kappa$ B, l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B. Cette phosphorylation induit la dégradation de I $\kappa$ B et permet une relocalisation nucléaire de NF- $\kappa$ B et l'activation de ses gènes cibles (Romashkova and Makarov, 1999). AKT peut aussi réguler l'activité du suppresseur de tumeur pro-apoptotique p53 en phosphorylant MDM2, un de ses partenaires. MDM2 est un régulateur négatif de p53 en ciblant cette protéine vers le protéasome. Deux études ont montré que la phosphorylation de MDM2 par AKT permet une translocation nucléaire plus efficace de MDM2 et une dégradation plus importante de p53 (Mayo and Donner, 2001; Zhou et al., 2001).

***Prolifération*** - AKT a un effet inhibiteur sur la dégradation de la cycline D1, un facteur clé dans la progression dans le cycle cellulaire. La kinase Glycogen Synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) phosphoryle la cycline D1, ce qui entraîne l'adressage de cette protéine au protéasome. AKT est capable de phosphoryler la kinase GSK3 $\beta$ , ce qui entraîne une inhibition de l'activité kinase de cette protéine et permet une accumulation de la cycline D1 (Diehl et al., 1998).

AKT est aussi capable de réguler négativement l'expression de certains inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire tel que p27/KIP1 (Dijkers et al., 2000; Graff et al., 2000; Medema et al., 2000) ou p21/WAF1 (Lawlor and Rotwein, 2000).

***Croissance cellulaire*** - La croissance cellulaire, autrement dite la taille des cellules est régulée par la synthèse de macromolécules qui entraînent une augmentation de la taille ou de la masse des cellules. Un des facteurs jouant un rôle particulièrement important dans la croissance cellulaire est la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Cette protéine

favorise la croissance cellulaire en activant les kinases de la famille RSK (Ribosomal protein S6 Kinase, composée des kinases RSK1, RSK2, RSK3). Ces kinases stimulent la traduction des ARNm portant une structure CAP en position 5'. mTOR est une cible directe d'AKT (Nave et al., 1999) mais le mécanisme précis de régulation de mTOR par AKT reste inconnu. Des études pharmacologiques utilisant la Rapamycine, l'inhibiteur de mTOR, ont montré que AKT régule la croissance des cellules musculaires par la voie mTOR. L'hypertrophie musculaire qui est induite par l'IGF-I ou l'expression d'une forme d'AKT constitutivement active est inversée suite au traitement par la Rapamycine (Bodine et al., 2001; Rommel et al., 2001).

#### *La voie Ras*

La deuxième voie majoritaire de transduction du signal de l'IGF-I est la voie de signalisation Ras/Raf/MAPKs. L'autophosphorylation du IGF-RI sur ces résidus tyrosine permet son interaction avec le domaine SH2 de la protéine Grb-2. C'est une protéine adaptatrice contenant deux domaines SH3 par lesquels elle est constitutivement liée à SOS (Son Of Sevenless) (McCormick, 1993). SOS est une protéine qui appartient à la famille des Ras guanine-nucleotide-exchange factors (GEFs) qui permet le passage de la forme Ras-GDP à la forme Ras-GTP. Ce passage de la forme GDP à la forme GTP entraîne un changement de conformation de la protéine Ras qui lui permet d'interagir avec un grand nombre de protéines qui permettront la transmission du signal induit par l'IGF-I. Un des partenaires les plus connus et les plus décrits de Ras est la protéine Raf. Cette interaction entre Ras-GTP et Raf permet une relocalisation de Raf au niveau de la membrane plasmique et sa phosphorylation (Moodie and Wolfman, 1994). Il existe trois isoformes de Raf : Raf1, A-Raf et B-Raf. La famille des protéines Raf est ensuite capable d'activer la cascade MEK-ERK.

La structure des MEKs se compose d'une extrémité amino-terminale qui a un rôle inhibiteur de l'activité kinase et une partie carboxy-terminale qui est nécessaire pour la liaison et l'activation des ERKs (Crews et al., 1992; Huang and Yen, 1995; Tanoue et al., 2001). Les protéines MEKs sont activées par la phosphorylation de deux résidus serines (Ser 217 et Ser 221 pour MEK1), mais bien que les trois isoformes de Raf soient capables de phosphoryler MEK1 et MEK2 *in vitro* (Marais et al., 1997) leur capacité à le faire *in vivo* diffèrent. La génération de souris knock out pour chacun des membres de cette famille indique qu'il existe des différences fonctionnelles au niveau du développement. Dans de nombreux tissus, B-Raf semble être un activateur clé de la voie MEK/ERK tandis que Raf1 n'est pas indispensable (Mikula et al., 2001).

Les substrats physiologiques principaux de MEK1 et MEK2 (MAPKK) sont les membres de la famille ERK (Extracellular Regulated Kinase), un sous groupe de la famille des MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinases) composée de trois groupes : les ERKs (1/2), les Jun amino-terminal Kinases (JNK1/2/3), les p38MAPK (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ). ERK1 et ERK2 ont été les kinases les plus étudiées dans la littérature. Les gènes ERK1 et ERK2 codent une protéine de 42 et 44 kD respectivement. Elles ont été originellement isolées pour leur capacité à phosphoryler MP2 (Microtubule-associated Protein 2) (Sturgill and Ray, 1986). Les ERKs sont activées par une double phosphorylation au niveau des résidus thréonine 182 et tyrosine 184 par la kinase MEK1 (Crews et al., 1992). Cette double phosphorylation permet la dimérisation de ERK, le maintien de son activation et sa localisation nucléaire (Khokhlatchev et al., 1998).

#### c/ Effets nucléaires de l'IGF-I

L'activation des voies MAPs kinases et PI3 kinases entraîne une cascade de phosphorylations qui se répercutent jusqu'au noyau. De nombreuses kinases vont pouvoir

ainsi phosphoryler un grand nombre de facteurs de transcription dont notamment NF- $\kappa$ B, CREB, Ets-1, AP1 et c-Myc.

### *NF- $\kappa$ B*

Le complexe NF- $\kappa$ B est composé de protéines ayant toutes en commun un domaine de 300 acides aminés appelé domaine d'homologie a Rel (Baldwin, 1996; Ghosh et al., 1998). Ce domaine permet la liaison à l'ADN (au niveau de séquences appelées  $\kappa$ B), la dimérisation et l'import nucléaire du complexe NF- $\kappa$ B. En plus de ce domaine, les membres de la famille NF- $\kappa$ B (c-Rel, RelB, p65) possèdent un domaine de transactivation de la transcription.

Les gènes régulés par NF- $\kappa$ B sont impliqués dans la synthèse de cytokines, de facteurs de croissance, de facteurs de transcription et de régulateurs de la prolifération et de l'apoptose (Schmitz and Baeuerle, 1991; Wang et al., 1998; Yamamoto and Gaynor, 2001).

Comme décrit plus haut dans l'introduction, avant l'activation des voies de transduction du signal par l'IGF-I, le complexe NF- $\kappa$ B est lié à l'inhibiteur I $\kappa$ B (famille de protéines composée de trois membres : I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ ). Cette liaison entraîne la séquestration du complexe NF- $\kappa$ B dans le cytoplasme (Whiteside and Israel, 1997). La modulation de l'activité du complexe NF- $\kappa$ B par les voies de transduction du signal se fait en grande partie indirectement. En effet des kinases telles que AKT ou MEK1 sont capables de phosphoryler le complexe IKK (I $\kappa$ B kinases) et de moduler son activité (Lee et al., 1998a; Ling et al., 1998; Nakano et al., 1998). Ce complexe formé de quatre sous-unités (1 IKK $\alpha$ , 1 IKK $\beta$ , 2 IKK $\gamma$  $\delta$ ) est capable de phosphoryler et d'induire la dégradation des inhibiteurs I $\kappa$ B et permettent ainsi une relocalisation nucléaire du complexe NF- $\kappa$ B (Israel, 2000; Karin, 1999; Karin and Ben-Neriah, 2000; Schmitz et al., 2001). D'autres travaux ont montré que la kinase

RSK1 était capable de phosphoryler I $\kappa$ B au niveau de la sérine 32 ce qui conduit à sa dégradation (Ghoda et al., 1997; Schouten et al., 1997).

L'activité transcriptionnelle du complexe NF- $\kappa$ B est aussi régulée directement par des phosphorylations au niveau de ces régions N-terminales (par la PKA (Schmitz and Baeuerle, 1991; Zhong et al., 1998)) et C-terminale (IKK (Sakurai et al., 1999; Wang and Baldwin, 1998; Wang et al., 2000)). La PKA est capable de phosphoryler la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B au niveau de la sérine 276 ce qui entraîne une interaction avec le co-activateur CBP/p300 tandis que la phosphorylation de la sous-unité p65 par IKK favorise la liaison à l'ADN du complexe NF- $\kappa$ B et ses propriétés de transactivation de la transcription.

### *CREB*

Le facteur de transcription CREB a été initialement découvert comme étant l'effecteur de la voie de signalisation activée par l'AMP cyclique. Il a ensuite été montré qu'il jouait un rôle important dans les voies de transduction du signal initiées par le calcium, les facteurs de croissance et les signaux de stress (Haus-Seuffert and Meisterernst, 2000; Muthusamy and Leiden, 1998). La famille CREB/ATF est composée des protéines CREB, CREM, ATF1, ATF2, ATF3 et ATF4 qui peuvent former entre elles des homodimères ou des hétérodimères. Parmi les gènes régulés par le système CREB/ATF on peut citer les gènes codant la cycline A (Djaborkhel et al., 2000; Shimizu et al., 1998), la cycline D1 (Nagata et al., 2001), c-Fos (Vanhoutte et al., 1999; Wang and Prywes, 2000) et Bcl 2 (Arcinas et al., 2001; Pugazhenthii et al., 1999; Wilson et al., 1996). Les produits de ces gènes sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Au niveau de l'activation transcriptionnelle, les partenaires principaux de CREB sont CBP (CREB Binding Protein) et p300. Quand le complexe CREB/ATF est associé à la protéine CBP, il peut se lier à l'ADN au niveau de la région CRE contenue dans le promoteur de ces gènes cibles. CBP peut ensuite faire le pont entre le

complexe CREB/ATF et les facteurs généraux de transcription (Chrivia et al., 1993; Nakajima et al., 1997a; Nakajima et al., 1997b). Cette activation de CREB est régulée par la phosphorylation de certains de ces résidus. La kinase RSK2 (Ribosomal protein S6 Kinase 2) est capable d'activer CREB en phosphorylant sa serine 133 (De Cesare et al., 1998; Xing et al., 1996). De plus il a été montré que la voie Ras active CREB dans de nombreux types cellulaires, ce qui entraîne un accroissement de la prolifération cellulaire (Impey et al., 1998; McCubrey et al., 2000; Vanhoutte et al., 1999). Il a été avancé l'hypothèse que l'effet de Ras sur la phosphorylation de CREB passe par la famille des kinases RSK (Bohm et al., 1995; Jordanov et al., 1997; Xing et al., 1996)

### *ETS*

La famille des facteurs de transcription ETS comprend les protéines Ets1, Ets2, Elk1, SAP1, SAP2 et d'autres facteurs de transcription (Wasylyk et al., 1993). Ces protéines ont en commun un domaine de 85 acides aminés appelé domaine de liaison à l'ADN ETS. La famille des facteurs de transcription ETS régule un grand nombre de gènes codant des facteurs de transcription (p53 (Venanzoni et al., 1996), c-Fos (Liu and Ng, 1994), NF- $\kappa$ B (Lambert et al., 1997)), des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (cycline D1 (Albanese et al., 1995), Rb (Tamir et al., 1999), p21 (Beier et al., 1999)), des protéines impliquées dans l'apoptose (Bcl2 (Frampton et al., 1996), Bcl-X1 (Sevilla et al., 1999) et Fas (Li et al., 1999)) des cytokines (GM-CSF (Coles et al., 2000) et IL-3 (Nimer et al., 1996)) et des facteurs de croissance (PDGF : Platelet Drived Growth Factor (Maul et al., 1998) et HB-EGF : Heparin binding EGF (McCarthy et al., 1997)). Pour activer la transcription, la famille des protéines ETS s'associe à d'autres facteurs de transcription (Mavrothalassitis and Ghysdael, 2000). Ets1 et Ets2 peuvent s'associer à des facteurs de transcription comme le complexe AP1 ou le complexe NF- $\kappa$ B et lient des sites Ets/AP1 ou Ets/NF- $\kappa$ B dans les promoteurs de leurs gènes

cibles. Ets1 et Ets2 sont des cibles des ERKs, ces protéines sont phosphorylées respectivement au niveau des résidus thréonine 38 et 72, ce qui entraîne leur activation (McCarthy et al., 1997; Yang et al., 1996). Dans les cellules NIH3T3, Ets2 activé coopère avec AP1 et cet hétérodimère se lie au niveau des sites Ets/AP1 sur le promoteur du gène Heparin Binding EGF (HB-EGF) et stimule sa transcription. Cette surexpression de HB-EGF est supposée être responsable de la transformation des NIH3T3 par la forme oncogène de Raf (McCarthy et al., 1997).

Les protéines Elk1, SAP1 et SAP2 forment un groupe appelé groupe TCF pour Ternary Complex Factor. Ils forment un complexe ternaire en s'associant à des dimères de protéines appelés SRF (Serum Response Factor) et activent la transcription de gènes contenant une séquence SRE (Serum Response Element). Elk1 est phosphorylé par les trois grandes voies des MAP kinases, les voies de la p38 MAPK, les JNKs et les ERKs, toutefois les résidus phosphorylés diffèrent (Yang et al., 1996; Yang et al., 1998). Les ERKs peuvent interagir avec Elk1 au niveau de sa région C-terminale et phosphoryler les sérines 383 et 389 dans ce domaine (Gille et al., 1995; Gille et al., 1992; Hill et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995). Cette double phosphorylation entraîne une meilleure affinité de Elk1 pour l'ADN et une activité transcriptionnelle accrue (Price et al., 1996; Yang et al., 1996; Yang et al., 1998). Par exemple un des gènes cible les plus étudié de Elk1 est le gène c-Fos. La phosphorylation de Elk1 par les ERKs entraîne la liaison de Elk1 au niveau de la séquence SRE et à l'activation de la transcription du gène c-Fos (Meyer-ter-Vehn et al., 2000; Premkumar et al., 2000; Wang and Prywes, 2000).

### *c-Myc*

c-Myc est un facteur de transcription qui régule tout un panel de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Amati et al., 2001; Dang, 1999; Facchini and Penn,



1998; Iritani and Eisenman, 1999; Nasi et al., 2001; Prendergast, 1999; Schmidt, 1999). Une expression dérégulée de c-Myc entraîne une prolifération cellulaire continue ou le déclenchement du processus d'apoptose selon les signaux reçus par la cellule. Pour jouer son rôle de facteur de transcription, c-Myc forme un hétérodimère avec la protéine Max. Cet hétérodimère peut lier l'ADN au niveau d'une séquence ADN appelée boîte E et activer la transcription de ses gènes cibles. C-Myc peut aussi se comporter comme un répresseur de la transcription en modulant l'activité de TF-II1 (Transcription Factor II1). Ce facteur de transcription peut lier l'ADN au niveau de séquences Inr (Initiator Element) et activer la transcription de ses gènes cible en recrutant plusieurs sous-unités de la machinerie de transcription. C-Myc peut former un hétérodimère avec TF-II1 et lier la séquence Inr. Mais la liaison de l'hétérodimère c-Myc/TF-II1 sur la séquence Inr ne permet pas le recrutement de facteurs additionnels et abolit la transcription des gènes cibles (Claassen and Hann, 1999; Li et al., 1994; Roy et al., 1993).

Parmi les gènes régulés par c-Myc on dénombre plusieurs gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. C-Myc active directement les gènes codant la cycline D1 (Daksis et al., 1994; Perez-Roger et al., 1999), la cycline D2 (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999) et Cdk4 (Hermeking et al., 2000). L'activation de ces gènes est associée à la progression dans le cycle cellulaire. L'activation de c-Myc est aussi associée à une activité accrue du complexe cyclineE/ Cdk2 (Perez-Roger et al., 1999; Perez-Roger et al., 1997). Ce complexe est impliqué dans la progression du cycle cellulaire et l'induction de son activité par c-Myc se fait par deux mécanismes. Premièrement, la cycline D, dont la production est stimulée par c-Myc, peut séquestrer la protéine p27/KIP1 (l'inhibiteur de Cdk2) du complexe cyclineE/Cdk2 et ainsi lever son effet inhibiteur (Perez-Roger et al., 1999). De plus la cycline E est une cible de c-Myc. L'augmentation de la synthèse de cycline E entraîne une activation de Cdk2 par une formation plus efficace des complexes cyclineE/Cdk2 (Perez-Roger et al.,

1997). De plus c-Myc peut aussi directement réprimer un certain nombre de gènes codant des inhibiteurs des Cdk kinases (les Cdk kinases sont des promoteurs du cycle cellulaire) comme p27/KIP1 (Yang et al., 2001), p21/WAF1 (Gartel et al., 2001), p15 (Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001). Il a été montré que le dimère Myc/Max est capable de réprimer l'expression du gène p27/KIP1 à travers l'élément Inr contenu dans son promoteur (Yang et al., 2001).

L'autre fonction majeure de c-Myc, qui est assez paradoxale au vu de son action sur la prolifération cellulaire, est son rôle dans le déclenchement de l'apoptose. Cette capacité de c-Myc à déclencher l'apoptose a été mise en évidence pour la première fois par Askew et ses collaborateurs (Askew et al., 1991). Ils ont observés que l'arrêt en G1 induit par la privation de cellules myéloïdes en cytokines était aboli dans les clones surexprimant c-Myc. Au lieu de s'arrêter en G1, les cellules rentraient massivement en apoptose. Des résultats similaires ont été observés dans des fibroblastes embryonnaires de rongeurs (Evan et al., 1992). De plus la présence de c-Myc est essentielle pour l'apoptose induite par divers agents tels que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), le taxol, l'étoposide, la doxorubicine ou les céramides (Dong et al., 1997; Janicke et al., 1994; Klefstrom et al., 1994; Soucie et al., 2001). Cet effet sur l'apoptose passe probablement par la régulation de p53 (Reisman et al., 1993; Roy et al., 1994) et de TRAP1 (Tumor necrosis factor Receptor Associated Protein 1) (Coller et al., 2000) dont les gènes sont les cibles de c-Myc.

La phosphorylation de c-Myc joue un rôle crucial dans la régulation de son activité, notamment au niveau de sa stabilité et de sa localisation cellulaire. C-Myc peut être phosphorylé par la kinase GSK3 $\beta$  et par la famille des ERKs (Alvarez et al., 1991; Henriksson et al., 1993; Pulverer et al., 1994). Ces kinases phosphorylent la thréonine 58 (T58) et la sérine 62 (S62) qui sont deux acides aminés critiques situés dans le domaine N-terminal de c-Myc. La mutagenèse de la T58 en alanine, un acide aminé non phosphorylable,

(T58A) entraîne la formation de foci dans des fibroblastes de souris transformés par Ras tandis que la mutation de la S62 en alanine (S62A) inhibe la transformation cellulaire dans ces mêmes cellules (Henriksson et al., 1993; Pulverer et al., 1994). De plus la mutation de ces deux résidus rétablit l'activité sauvage de c-Myc, ce qui indique que la phosphorylation différentielle de ces deux résidus joue un rôle crucial dans l'orientation de l'action de c-Myc. De plus il a été suggéré que la phosphorylation de la T58 facilite la protéolyse rapide de c-Myc par le système ubiquitine protéasome (Gregory and Hann, 2000; Salghetti et al., 1999). En revanche la phosphorylation de la S62 accroît significativement la demi vie de c-Myc (Niklinski et al., 2000). La phosphorylation de la T58 est aussi essentielle pour la séquestration de c-Myc dans le cytoplasme par les microtubules (Niklinski et al., 2000). Cette liaison entre c-Myc et la  $\alpha$ -tubuline (Alexandrova et al., 1995) empêche c-Myc de jouer son rôle de facteur de transcription. Dans la lignée mutante de fibroblaste T58A c-Myc ne lie pas la  $\alpha$ -tubulin, il devient un activateur constitutif de la transcription et cela entraîne une stimulation de la prolifération cellulaire (Niklinski et al., 2000).

En résumé, des kinases telles que GSK3 $\beta$  ou la famille des ERKs phosphorylent c-Myc sur les résidus 58 et 62 et modulent ainsi positivement ou négativement ses propriétés de transactivation.

Une autre cible important des voies de transduction du signal activées par l'IGF-I est le complexe AP1. Ce facteur de transcription a été abondamment étudié et sera détaillé dans le chapitre suivant de cette étude bibliographique.

### 3/ Régulation de la voie IGF-I et connections avec les autres voies de signalisation

#### a/ Les protéines tyrosines phosphatases

Un évènement clé de la transduction du signal par le système IGF-I est la phosphorylation de résidus tyrosines, que ce soit au niveau du IGF-RI ou de ses adaptateurs. La modification de ces résidus tyrosines peut être régulée par des protéines à activité tyrosine phosphatases qui peuvent déphosphoryler ces résidus tyrosine. Parmi ces phosphatases on peut citer SHP1 et SHP2. Ces tyrosines phosphatases possèdent deux domaines SH2 qui leur permettent d'interagir avec les récepteurs à activité tyrosine kinase (Matthews et al., 1992; Shen et al., 1991). Toutefois SHP1 et SHP2 ont des rôles opposés, SHP1 diminue la signalisation tyrosine kinase de ces cibles tandis que SHP2 l'augmente (Julie A. Frearson, 1997). Il a été démontré que SHP1 était capable d'interagir avec le récepteur à l'EGF et d'inhiber son activité tyrosine kinase (Tomic et al., 1995) en revanche aucune interaction avec le IGF-RI n'a été démontrée.

L'impact de l'activité tyrosine phosphatase sur le système IGF-I a été mis en évidence par l'effet anti facteur de croissance du Tamoxifène. En effet, dans les cellules MCF-7, l'administration de Tamoxifène bloque l'effet prolifératif induit par l'IGF-I (Vignon et al., 1987). Le blocage de cet effet prolifératif est du à l'augmentation d'expression d'une phosphatase : PTPL1 qui provoque une baisse de la phosphorylation d'IRS1 et d'AKT et induit une plus forte sensibilité à l'apoptose (Bompard et al., 2002).

#### b/ Dialogue entre oestradiol et IGF-I

Il est connu depuis un certain temps que l'oestradiol a des effets rapides dans une cellule qui ne peuvent s'expliquer par un effet transcriptionnel sur les gènes cibles du RE. Il a été montré que le RE $\alpha$  lié à l'oestradiol est capable d'activer plusieurs voies de signalisation cytoplasmiques, notamment il active ERK 1 et 2. Plusieurs équipes ont montré que le complexe E2/RE est capable de lier c-src dans les cellules MCF-7. C-src activé phosphoryle Shc qui peut s'associer au complexe Grb2/SOS et ainsi en aval les protéines Raf1, Ras et

ERKs seront activées (Castoria et al., 1999; Migliaccio et al., 1996). Il a ensuite été découvert que le RE lié à l'E2 est capable d'interagir avec le IGF-RI et d'induire sa phosphorylation. Cela se traduit ensuite par une phosphorylation des kinases ERK1 et 2 (Kahlert et al., 2000).

Le RE lié à l'E2 peut interagir avec la sous unité régulatrice p85 $\alpha$  de la PI3 kinase et cela entraîne une activation de la voie AKT (Simoncini et al., 2000). Cette activation de la voie AKT se fait grâce à la formation d'un complexe ternaire entre E2/RE $\alpha$ , p85 $\alpha$  et c-src (Castoria et al., 2001).

Le traitement par E2 active aussi la voie IGF-I en stimulant l'expression de nombreux maillons de cette chaîne de transmission du signal. On peut citer entre autre les gènes codant IGF-RI, IRS-1, certaines IGFBPs, comme étant des cibles régulées positivement par l'oestradiol (Huynh et al., 1996; Lee et al., 1999; Molloy et al., 2000; Perks and Holly, 2000)

#### c/ Connexions entre la voie IGF-I et d'autres voies de transduction de signal

Le IGF-RI n'est pas le seul récepteur à activité tyrosine kinase à pouvoir activer des voies de signalisations telles que Ras ou celle de la PI3K. Le facteur de croissance EGF par exemple a un modus operandi proche de celui de l'IGF-I ; il peut lier un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase et activer des voies de transduction du signal de la même manière que l'IGF-I. Il a été montré que ces voies pouvaient rentrer en compétition ; par exemple la surexpression de Erb2 (le récepteur transmembranaire de l'EGF) inhibe la signalisation Shc-MAPK induite par l'IGF-I (Lu et al., 2004). Cette interconnexion entre IGF-I et EGF peut aussi être la cause de résistances à certaines thérapies anti cancéreuses. La stimulation de cellules MCF-7 surexprimant Erb2 (l'un des récepteurs membranaires de l'EGF) par de l'IGF-I atténue l'effet de l'Herceptin (un anticorps dirigé contre le récepteur Erb2 et qui bloque son activité). D'autres travaux ont montré que le traitement par l'Erlotinib (un autre inhibiteur de Erb2 qui se fixe au niveau de son site de liaison à l'ATP dans sa région

cytoplasmique) induit une hétérodimérisation des récepteurs à l'IGF et à l'EGF. Cette hétérodimérisation entraîne en aval l'induction du gène codant la survivine, un puissant anti apoptotique, qui contrecarre ainsi l'effet de l'Erlotinib (Morgillo et al., 2006).

Ainsi la transmission des signaux mitogènes et anti apoptotiques induit par l'IGF-I fait intervenir un grand nombre de protéines ayant différents rôles : récepteurs membranaires ou transmembranaires, adaptateurs, kinases... Ce système de transduction du signal est finement régulé, d'une part grâce à l'existence de tyrosine phosphatases qui permettent un équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation des résidus tyrosine et d'autre part, par l'existence d'autres facteurs de croissance ou stimuli mitogènes partageant les mêmes voies de transduction du signal.

## **E/ Le complexe AP1**

### 1/Présentation générale du complexe

#### a/ La famille des protéines AP1

Le facteur de transcription AP1 (Activator Protein 1) est un complexe dimérique qui comprend les membres des familles de protéines JUN (c-Jun, JunB et JunD), FOS (c-Fos, FosB, Fra1 et Fra2), ATF (pour Activating Transcription Factor ; ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 et JDP2) et MAF (pour Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma ; c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K et Nrl). Le complexe AP1 peut ainsi former toute une combinatoire d'homodimères et d'hétérodimères à partir de l'ensemble de ces protéines. Cet ensemble de combinaison permet de définir le gène qui sera régulé par le complexe AP1 (Chinenov and Kerppola, 2001; Vogt, 2002). Les protéines AP1 appartiennent à la catégorie des protéines à doigt de zinc car elles dimérisent grâce à un domaine en doigt de zinc et elles contiennent un domaine basique pour l'interaction avec l'ADN (Glover and Harrison, 1995). Chez les

## Manipulation génétique

| <i>génération de souris Knockout pour</i> | <i>phénotype</i>   | <i>organes et type cellulaires touchés</i> |
|---|--|--|
| c-Jun                                     | Léthalité embryonnaire au stade E12.5  | Foie, coeur, hépatocytes, crête neurale    |
| JunB                                      | Léthalité embryonnaire au stade E10  | Tissus extra-embryonnaire, placenta        |
| JunD                                      | Stérilité masculine  | Testicule, spermatozoïdes                  |
| c-Fos                                     | Ostéoporose  | Os, ostéoclastes                           |
| FosB                                      | Défaut de développement  | Cerveau, hypothalamus                      |
| Fra1                                      | Léthalité embryonnaire au stade E9.5   | Tissus extra-embryonnaire, placenta        |
| Fra2                                      | Léthal à la naissance  | Os, coeur, intestins                       |
| <i>génération de souris Knock-in</i>      |  |  |
| JunB à la place de c-Jun                  | Sauve de la léthalité embryonnaire de souris KO pour c-Jun, jusqu'à la naissance | Structure antérieure de l'oeil<br>coeur    |
| JunD à la place de c-Jun                  | Sauve de la léthalité embryonnaire de souris KO pour c-Jun, jusqu'à la naissance | Structure antérieure de l'oeil<br>coeur    |
| Fra1 à la place de c-Fos                  | Annule l'ostéoporose induite par le KO de c-Fos                                  | Aucun                                      |
| <i>promoteur - transgene</i>              |  |  |
| H2Kb-c-Jun                                | Aucun  | Aucun                                      |
| UbC-JunB                                  | Aucun  | Aucun                                      |
| CD4-JunB                                  | Facilite la maturation de lymphocytes T-helper2                                  | Thymus, thymocytes CD4                     |
| UbC-JunD                                  | Réduction du nombre de cellules Tet B périphériques                              | Lymphocytes, colon                         |
| H2Kb-c-Fos                                | Ostéosarcomes  | Os, ostéoblastes                           |
| H2Kb-FosB                                 | Aucun  | Aucun                                      |
| Tcrb-ΔFosB                                | Défaut de différenciation des lymphocytes T                                      | Thymus et thymocytes immatures             |
| NSE-ΔFosB                                 | Ostéosclérose  | Os, ostéoblastes                           |
| H2Kb-Fra1                                 | Ostéosclérose  | Os, ostéoblastes                           |
| CMV-Fra2                                  | Malformations oculaires  | Structure antérieure de l'oeil             |
| H2Kb-Fra2                                 | Formation de tumeurs   | Pancréas, thymus, poumon                   |

Table 5 : Phénotypes associées à la sur ou sous expression des différentes sous unités du complexe API chez la souris

mammifères les composants majoritaires du complexe AP1 sont les protéines des familles JUN et FOS. La famille des protéines JUN est capable de former des homodimères avec les membres de sa propre famille ou des hétérodimères avec la famille FOS tandis que la famille FOS est seulement capable de former des hétérodimères avec la famille JUN (Chinenov and Kerppola, 2001; Vogt, 2002). Ces dimères (JUN-JUN ou JUN-FOS) sont capable de lier une séquence d'ADN spécifique appelée élément de réponse au TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) dont la séquence est 5'-TGA(G/C)TCA-3'.

#### b/ Rôle du complexe AP1 dans le développement du cancer.

Les protéines JUN et FOS ont été originellement découvertes sous leur forme virale comme étant de puissants oncogènes dans l'ostéosarcome de Finkel-Biskis-Jenkins (pour v-Fos) et dans le virus du sarcome aviaire (pour v-Jun) (Vogt, 2002). De plus la suractivation des homologues cellulaires de v-Jun et v-Fos, soit par surexpression ou en utilisant une forme constitutivement active de Ras, à un effet positif sur la prolifération cellulaire. Ensuite d'autres membres de la famille JUN (JunB et JunD) et de la famille FOS (FosB, Fra1 et Fra2) ont été identifiés comme faisant partie du complexe AP1. La fonction de chacune de ces protéines a été étudiée en utilisant des souris génétiquement modifiées (Angel and Karin, 1991)(cf. table 5). Un certain nombre de sous unités du complexe AP1 comme c-Jun, c-Fos ou FosB peuvent transformer efficacement la majorité des types cellulaires et chacune de ces protéines contient des domaines de transactivation de la transcription (Jochum et al., 2001). C-Fos, quand il est largement exprimé chez la souris induit la formation d'ostéosarcomes par la transformation des chondroblastes et des ostéoblastes qui sont donc deux cibles de c-Fos dans la tumorigenèse (Grigoriadis et al., 1993; Wang et al., 1991). C-Jun à une importance plus grande dans les tumeurs de la peau et du foie car l'utilisation d'un dominant négatif de c-Jun (TAM67) dans des kératinocytes ou l'inactivation de c-Jun dans le foie retarde le



développement de tumeurs de la peau ou du foie chimio-induites (Eferl et al., 2003; Young et al., 1999). En revanche les sous unités du complexe AP1 qui n'ont pas de domaine de transactivation de la transcription fonctionnel, ont de faibles activités transformantes (dans le cas de Fra1 ou Fra2 (Bergers et al., 1995; Foletta et al., 1994)) ou aucune activité transformante (cas de JunB et JunD (Vandel et al., 1995)).

#### c/ Antagonisme entre les différents composants du complexe AP1

Contrairement à c-Jun ou c-Fos, qui possèdent un fort potentiel oncogène, certaines des sous unités du complexe AP1 qui n'ont pas de domaine de transactivation de la transcription peuvent avoir des propriétés de suppresseur de tumeurs (Deng and Karin, 1993). Par exemple JunB et JunD, au contraire de c-Jun, peuvent avoir des propriétés anti-oncogènes. L'antagonisme du complexe c-Jun/JunB sur la transformation oncogénique a été décrit pour la première fois dans des fibroblastes de rongeur *in vitro* (Chiu et al., 1989). De plus l'activité anti-oncogène de JunB a été plus récemment confirmée *in vivo* par l'utilisation de souris déficientes en JunB. Ces souris souffrent d'une maladie proche d'une leucémie myéloïde humaine chronique, de plus la réexpression ectopique de JunB dans ces souris permet d'inverser ce phénotype hyperprolifératif des cellules myéloïdes (Passegue et al., 2001). L'inactivation conditionnelle de JunB dans des cellules épithéliales de souris JunB +/- provoque aussi la formation spontanée de papillomes, ce qui suggère que JunB a une activité de suppresseur de tumeur dans un nombre important de tissus (Zenz et al., 2003).

En revanche l'activité anti-oncogène de JunD est beaucoup plus floue. Des études ont montré que JunD est un régulateur négatif de la prolifération (Pfarr et al., 1994). Toutefois les souris qui n'expriment pas JunD ne développent pas de tumeurs spontanées (Thepot et al., 2000). De plus l'interaction directe de JunD avec le suppresseur de tumeur Menin semble impliqué dans la suppression de la croissance néoplastique de certaines tumeurs. L'inhibition

de l'activité de JunD par un suppresseur de tumeur suggère que JunD puisse aussi fonctionner comme une oncoprotéine (Agarwal et al., 1999).

Ainsi le comportement du complexe AP1 en tant qu'oncogène ou non dépend de sa composition et des antagonismes qui existent entre ses différentes sous-unités. Mais le comportement du complexe AP1 n'est pas seulement dicté par sa composition en protéines JUN ou FOS, son activité dépend aussi grandement du contexte cellulaire, du type et du grade de la tumeur considérée et de son fond génétique. Par exemple la délétion de c-Fos dans des souris invalidées pour le gène Trp53 (p53 murine) entraîne la formation de rhabdomyosarcomes (tumeur dérivée de cellules musculaires primitives) qui ont une très forte pénétrance (Fleischmann et al., 2003). Ce type de tumeur est rarement observé chez des souris Trp53  $-/-$ , ce qui indique que même un puissant oncogène tel que c-Fos peut dans certains cas se comporter comme un anti-oncogène.

## 2/ Les fonctions spécifiques du complexe AP1

### a/ Dans la prolifération cellulaire

Le complexe AP1 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire et est un facteur déterminant dans la formation de tumeurs (Liu et al., 2002; Park et al., 1999). Pourtant le complexe AP1 ne se comporte pas systématiquement comme un activateur de la prolifération, il peut aussi avoir des activités anti-prolifératives. Les composants du complexe qui guident ce choix entre activité proliférative ou anti-proliférative semblent être la famille JUN tandis que les protéines de la famille FOS ont peu d'influence sur ce choix (Shaulian and Karin, 2001).

C-Jun est un régulateur positif de la prolifération cellulaire, en effet des fibroblastes déficients en c-Jun montrent un défaut de prolifération *in vitro* (Schreiber et al., 1999; Wisdom et al., 1999). On retrouve le même défaut de prolifération cellulaire *in vivo* dans des

| Produit du gène    | Activité                                       | Régulateur principal  | Références                                  |
|--------------------|--|---|---|
| DNMT1              | méthylation de l'ADN                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Bakin et al., 1999                          |
| EGFR               | Stimule la prolifération                       | c-Jun (stimule l'expression),<br>JunB (stimule l'expression)                                | Zenz et al., 2003                           |
| HB-EGF             | Stimule la prolifération                       | c-Jun (stimule l'expression)  | Szabowski et al., 2000                      |
| GM-CSF             | Stimule la prolifération                       | c-Jun (stimule l'expression),<br>JunB (inhibe l'expression)                                 | Park et al., 1999                           |
| KGF                | Stimule la prolifération                       | c-Jun (stimule l'expression),<br>JunB (inhibe l'expression)                                 | Shaulian et al., 2000                       |
| CyclinD1           | Inhibe la prolifération                        | c-Jun (stimule l'expression),<br>JunB (inhibe l'expression)                                 | Bakiri et al., 2000                         |
| WAF1               | Inhibe la prolifération                        | c-Jun (inhibe l'expression)   | Shaulian et al., 2000                       |
| p53                | Inhibe la prolifération,<br>Stimule l'apoptose | c-Jun (inhibe l'expression)   | Schreiber et al., 1999                      |
| ARF                | Inhibe la prolifération,<br>Stimule l'apoptose | JunD (inhibe l'expression)  | Weitzman et al., 2000                       |
| INK4A              | Inhibe la prolifération,<br>Stimule l'apoptose | c-Jun (inhibe l'expression),<br>JunB (stimule l'expression)                                 | Passegue, 2000                              |
| FASL               | Stimule l'apoptose                             | c-Fos (stimule l'expression),<br>c-Jun (stimule l'expression)                               | Kasibhatla et al., 1998                     |
| FAS                | Stimule l'apoptose                             | c-Jun (inhibe l'expression)   | Ivanov et al., 2001                         |
| BIM                | Stimule l'apoptose                             | c-Jun (stimule l'expression)  | Whitfield et al., 2001                      |
| BCL2               | Inhibe l'apoptose                              | JunB (inhibe l'expression)  | Passegue et al., 2001                       |
| BCL-XL             | Inhibe l'apoptose                              | JunB (inhibe l'expression)  | Passegue et al., 2001                       |
| BCL3               | Inhibe l'apoptose                              | c-Jun (stimule l'expression)  | Rebollo et al., 2000                        |
| VEGFD              | Angiogénèse                                    | c-Fos (stimule l'expression)  | Marconcini et al., 1999                     |
| uPA                | Angiogénèse                                    | FRA1 (stimule l'expression)   | Kustikova et al., 1998                      |
| uPAR<br>Proliferin | Angiogénèse<br>Angiogénèse                     | FRA1 (stimule l'expression)<br>c-Jun (stimule l'expression),<br>JunB (stimule l'expression) | Kustikova et al., 1998<br>Toft et al., 2001 |
| MMP1               | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression),<br>FRA1 (stimule l'expression)                                | Hu et al., 1994                             |
| MMP3               | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression),<br>FRA1 (stimule l'expression)                                | Hu et al., 1994                             |
| CD44               | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression),<br>c-Jun (stimule l'expression)                               | Lamb et al., 1997                           |
| CathepsinL         | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Hennigan et al., 1994                       |
| MTS1               | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Hennigan et al., 1994                       |
| KRP1               | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Spence et al., 2000                         |
| TSC36/FRP          | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Hennigan et al., 1994                       |
| Ezrine             | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Jooss and Muller, 1995                      |
| Tropomyosine3      | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Jooss and Muller, 1995                      |
| Tropomyosine5b     | Agressivité tumorale                           | c-Fos (stimule l'expression)  | Jooss and Muller, 1995                      |

Table 6 : Liste des principaux gènes régulés par les différentes sous unités de API

hépatocytes déficients en c-Jun durant la régénération du foie (Behrens et al., 2002). Pour exercer son action de manière optimale sur la progression du cycle cellulaire c-Jun doit être activé par les JUN-aminoterminal-kinases (JNKs) (Behrens et al., 1999). Ainsi le complexe AP1 contenant c-Jun activé est capable d'induire la transcription de régulateurs positifs du cycle cellulaire tels que cyclineD1 et de réprimer celle d'inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire tels que p53 et l'inhibiteur de CDKs (Cyclin Dependant Kinases) INK4A (aussi connu sous le nom de p16) (cf. table 6 pour un aperçu général des gènes régulés par le complexe AP-1) (Schreiber et al., 1999)).

En revanche JunB et JunD sont en général considérés comme des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Des fibroblastes dérivés de souris surexprimant JunB montrent une prolifération réduite (Passegue and Wagner, 2000) tandis que des fibroblastes immortalisés déficients en JunD montre une plus forte prolifération (Weitzman et al., 2000). Toutefois des fibroblastes primaires déficients en JunD ont une prolifération plus faible (Weitzman et al., 2000), ce qui indique que JunD peut réguler la progression du cycle cellulaire positivement ou négativement selon le contexte cellulaire. De plus JunB et JunD peuvent antagoniser efficacement l'action de c-Jun en modifiant l'expression de régulateurs cruciaux du cycle cellulaire ((Pfarr et al., 1994) et table 6). Par exemple la surexpression de JunB bloque l'activation de la cyclineD1 induite par c-Jun dans les fibroblastes (Passegue and Wagner, 2000). En plus de cette inhibition compétitive de c-Jun, les complexes AP1 contenant JunB régulent directement l'expression de certains composants du cycle cellulaire indépendamment de c-Jun, comme par exemple INK4A (cf. table 6 et (Passegue and Wagner, 2000)).

b/ Dans la survie cellulaire

Des études *in vitro* indiquent que l'activité du complexe AP1 peut entraîner l'apoptose dans certains types cellulaires y compris dans certaines tumeurs humaines (Shaulian and Karin, 2001). Toutefois l'activité oncogène du complexe AP1 est capable d'antagoniser efficacement l'apoptose dans les tumeurs du foie (Eferl et al., 2003). Le meilleur exemple de la dualité de l'action du complexe AP1 au niveau de l'apoptose est bien illustré par le double rôle de c-Jun dans les cellules neuronales et les hépatocytes. L'augmentation de l'activité de c-Jun induit l'apoptose dans les cellules neuronales *in vitro*. Quand l'activité de c-Jun est altérée dans des souris, soit par l'invalidation de la voie JNK (JNK3 KO) ou en utilisant un mutant de c-Jun inactivable par la voie JNK (les serines 63 et 73 cibles des JNKs remplacées par des alanines), les neurones de l'hippocampe sont protégés de l'apoptose induite par le kainate (Behrens et al., 1999; Yang et al., 1997; Zhang et al., 2002). En revanche c-Jun est requis pour la survie des hépatocytes fœtaux qui rentrent massivement en apoptose dans les souris invalidées pour c-Jun (Eferl et al., 1999). Le comportement cellulaire spécifique du complexe AP1 au niveau de l'apoptose est certainement dû à une différence dans la régulation de ses gènes cibles (cf. table 6). Dans les cellules neuronales, par exemple, c-Jun régule positivement l'expression de Bim, un agent pro-apoptotique de la famille Bcl2, qui est capital pour le déroulement normal de l'apoptose dans ces cellules (Whitfield et al., 2001). En revanche JunD semblent réguler les gènes qui protègent les cellules de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) (Lamb et al., 2003) et des hépatocytes déficients en c-Jun et JunD montrent une sensibilité plus grande au TNF $\alpha$  (Eferl et al., 2003; Weitzman et al., 2000).

Cette dualité d'action du facteur de transcription AP1 sur la régulation de la survie cellulaire montre que son fonctionnement est complexe et qu'il peut se comporter comme un oncogène ou un anti-oncogène selon son environnement cellulaire.

### c/ Dans l'angiogénèse

Certains gènes régulés par le complexe AP1 ont un rôle putatif dans l'angiogénèse (cf. table 6). Ce processus requiert la dégradation des composants de la matrice extracellulaire la migration cellulaire et la formation de vaisseaux sanguins. C-Fos et Fra1 régulent l'expression de métallo protéinases de la matrice (MMPs) comme MMP1 et MMP3 (Hu et al., 1994) et de la protéase Upa (Urokinase Plasminogen System) (Kustikova et al., 1998) qui favorise l'angiogénèse. De plus le gène codant le VEGF D (Vascular Endothelial Growth Factor D) a été identifié comme étant une cible de c-Fos (Marconcini et al., 1999). La famille JUN semble aussi jouer un rôle dans l'angiogénèse. Par exemple c-Jun et JunB sont surexprimés durant la progression tumorale de fibrosarcomes et augmentent leur angiogénèse en activant le facteur angiogénique proliférine (Bossy-Wetzel et al., 1992; Toft et al., 2001). De plus l'expression de la proliférine est supprimée dans le placenta de fœtus déficients en JunB, ce qui cause une altération de l'angiogénèse et une létalité embryonnaire (Schorpp-Kistner et al., 1999).

Le complexe AP1 régule aussi plusieurs gènes impliqués dans la progression métastatique (cf. table 6). Une des étapes importantes de cette progression est le passage de la cellule d'une morphologie épithéliale à une morphologie mésenchymateuse, cette progression est appelée la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour Epithelial-Mesenchymal Transition). C-Jun et c-Fos sont capables de provoquer le phénomène d'EMT, qui est associée à une perte de la polarité cellulaire dans les cellules épithéliales mammaires (Fialka et al., 1996; Reichmann et al., 1992). En revanche, seule la surexpression de c-Fos est capable d'induire une prolifération invasive de cellules poussant sur du collagène ce qui indique que c-Fos à un rôle plus important que c-Jun durant les stades tardifs de la tumorigénèse (Reichmann et al., 1992).

### 3/ La régulation de l'activité du complexe AP1

La régulation de ce facteur de transcription est complexe et intervient à plusieurs niveaux : pour la composition du dimère, par des régulations transcriptionnelles et post traductionnelles et par l'interaction avec ses partenaires protéiques.

#### a/ La composition des dimères

L'activité du complexe AP1 varie selon sa composition en dimères. L'expression des différentes sous unités de ce complexe varie selon les tissus, entraînant des différences d'activité du complexe AP1 selon le type cellulaire considéré. La différence d'activité entre plusieurs de ces dimères a été étudiée en liant différents membres des familles JUN et FOS par une chaîne peptidique flexible. Ces travaux ont montré que c-Jun-Fra2 mais pas c-Jun-Fra1 ou c-Jun-c-Fos inhibent l'arrêt de la croissance de fibroblastes immortalisés en condition de faible concentration en sérum (Bakiri et al., 2002). D'autres travaux utilisant des mutants de la région leucine zipper, permettant seulement la formation d'une seule forme de dimères, ont montré que le programme de transformation cellulaire induit par c-Jun se décompose en deux étapes. Dans un premier temps l'activité du complexe c-Jun-ATF2 fait évoluer la prolifération vers une voie indépendante des facteurs de croissance puis l'activité du dimère c-Jun-c-Fos permet le déclenchement d'une prolifération adhésion indépendante (van Dam and Castellazzi, 2001).

#### b/ Les régulations transcriptionnelles et les modifications post-traductionnelles

L'activité du complexe AP1 est induite par un grand nombre de stimuli et de signaux extracellulaires. Parmi ceux-ci on peut compter les facteurs de croissance, les cytokines, les neurotransmetteurs, les hormones peptidiques, les interactions cellule-matrice, les infections bactériennes ou virales et toute une variété de stress chimiques ou physiques. L'ensemble de ces stimuli peut activer la voie des MAP kinases et notamment la sous-famille des ERKs. Ces

kinases, une fois activées seront importées dans le noyau et auront divers rôles au niveau de l'activité du complexe AP1.

Au niveau transcriptionnel, elles vont induire l'activité transcriptionnelle des TCFs (Ternary Complex Factor, famille de protéines décrites précédemment dans cette étude bibliographique composée des facteur de transcription Elk1, SAP1 et SAP2) qui lient le promoteur du gène c-Fos et activent sa transcription (Hill et al., 1994). Une autre voie d'activation transcriptionnelle passe par la kinase ERK5 qui est capable de phosphoryler le facteur de transcription MEF2C (Monocyte specific Enhancer binding Factor 2C), qui peut ainsi coopérer avec c-Fos nouvellement synthétisé pour activer la transcription du gène c-Jun (Kato et al., 1997).

Au niveau post traductionnel les ERKs sont capable de phosphoryler directement Fra1 et Fra2 en réponse à une stimulation par du sérum et semblent augmenter leur activité de liaison à l'ADN quand ils sont associés à c-Jun (Gruda et al., 1994).

Une autre sous-famille des MAPK kinases, les JNKs (Jun N-terminal Kinase) est capable d'activer efficacement le complexe AP1. Ces kinases, qui comprennent trois isoformes, JNK1, JNK2 et JNK3 (Davis, 2000), sont capable de phosphoryler c-Jun dans sa région N-terminale, au niveau des sérines 63 et 73. Ces phosphorylation augmentent le potentiel de transactivation de la transcription de c-Jun (Karin, 1995). Les JNKs sont aussi capable de phosphoryler ATF2 qui peut ainsi former un hétérodimère avec c-Jun et lier un site AP1 sur le promoteur de c-Jun (Gupta et al., 1995). De la même manière, l'expression constitutive d'oncogènes tels que Ha-Ras résulte en une augmentation de l'activité transcriptionnelle du complexe AP1 (Schonthal et al., 1988). Cette activation du complexe AP1 passe principalement par une activation persistante des voies ERKs et JNKs (Derijard et al., 1994; Hibi et al., 1993).



En revanche en ce qui concerne c-Fos, la littérature scientifique sur les kinases ciblant cette protéine et les conséquences de cette phosphorylation est beaucoup moins abondante. Des travaux réalisés en 2002 ont montré que c-Fos fonctionne comme un senseur des ERK kinases, une activation transitoire de ces kinases n'est pas suffisante pour phosphoryler c-Fos tandis qu'une activation soutenue de la voie ERK entraîne la phosphorylation et la stabilisation de c-Fos qui peut ainsi transmettre le message (Murphy et al., 2002). Il existe plusieurs candidats comme FRK (Fos Related Kinase) (Deng and Karin, 1994), la famille RSK (Ribosomal S6 Kinase), ERK (Chen et al., 1993; Chen et al., 1996), la MAP kinase Mos (Okazaki and Sagata, 1995) et la MAP kinase p38 (Tanos et al., 2005). La phosphorylation de c-Fos par ces kinases au niveau de son domaine C-terminal entraîne une stabilisation de la protéine. Toutefois l'impact de ces kinases sur l'activité transcriptionnelle de c-Fos reste assez flou.

#### c/ Les partenaires du complexe AP1 pour l'activation transcriptionnelle

Le nombre de facteurs capables d'interagir avec le complexe AP1 est important et en constante augmentation. Parmi ces protéines on peut citer le facteur de transcription STAT3 qui peut interagir avec c-Jun (Zhang et al., 1999). STAT3 et le complexe AP1 sont, entre autres, capables de coopérer pour supprimer la transcription du récepteur de mort cellulaire Fas (Ivanov et al., 2001). Une autre catégorie de facteurs de transcription capables d'interagir avec le complexe AP1 est la super famille des récepteurs nucléaires comme le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) (Chinenov and Kerppola, 2001; Herrlich, 2001) ainsi que le récepteur des oestrogènes (Teyssier et al., 2001).

#### d/ Le RE $\alpha$ et le complexe AP1

Les relations entre le complexe AP1 et le RE $\alpha$  ont été abondamment étudiées. Il a été montré que le RE $\alpha$  est capable d'interagir directement avec c-Jun de manière ligand dépendante (Teyssier et al., 2001). Toutefois le mécanisme de coopération entre RE $\alpha$  et le complexe AP1 pour l'activation de la transcription paraît assez complexe. Il est couramment admis que le RE $\alpha$  augmente l'activité transcriptionnelle du complexe AP1 (Gaub et al., 1990; Philips et al., 1993; Philips et al., 1998; Webb et al., 1995; Webb et al., 1999). Toutefois il existe deux voies d'activation du complexe AP1 par le RE $\alpha$ , selon qu'il est, soit lié à son ligand naturel l'oestradiol, soit lié à un SERM tel que le Tamoxifène ou le Raloxifène. Quand le RE $\alpha$  est lié à l'oestradiol il régule positivement l'action du complexe AP1 par une interaction directe (Teyssier et al., 2001) et il nécessite l'intégrité de ses domaines AF-1 et AF-2 (Webb et al., 1999). Cette coopération se fait probablement en aidant au recrutement de co-activateurs transcriptionnels tel que la famille des p160 (SRC1, SRC2, SRC3). Il a notamment été montré que SRC1 était capable d'interagir directement avec c-Jun et c-Fos (Lee et al., 1998b). De plus il a récemment été montré que le complexe AP1 et SRC3 sont capables de coopérer pour la transcription du gène IRS-2 et le knock down de c-Fos entraîne une baisse significative du recrutement de SRC-3 sur ce promoteur (Yan et al., 2006).

Le RE $\alpha$  lié au SERM Tamoxifène peut aussi réguler positivement l'activité transcriptionnelle du complexe AP1. Toutefois cette activité n'est observée que dans certains types cellulaires (comme dans l'utérus par exemple) et nécessite seulement le domaine A/B et le domaine de liaison à l'ADN du RE $\alpha$  (Webb et al., 1995). Dans ce cas de figure, le mécanisme d'activation du complexe AP1 reste mal connu et une hypothèse plausible serait que le RE $\alpha$  lié au Tamoxifène n'interagisse pas avec le complexe AP1 mais qu'il titre simplement les co-répresseurs, tels que N-Cor (Nuclear Corepressor) ou les HDACs (Histone déacétylases), qui pourraient potentiellement interagir avec le complexe AP1.

## **F/ Objectif des travaux**

L'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  est étroitement liée aux voies de transduction du signal régulées par les facteurs de croissance. L'IGF-I est un facteur de croissance qui joue un rôle important dans le développement de la glande mammaire. Les liens entre la voie de signalisation régulée par l'IGF-I et la voie de signalisation régulée par les oestrogènes sont nombreux et se retrouvent dans plusieurs compartiments de la cellule (membrane plasmique, cytoplasme, noyau). Le but des travaux présentés dans ce manuscrit a été d'étudier ces liens entre le RE $\alpha$  et la signalisation IGF-I au niveau des gènes oestrogéno-régulés et principalement du gène de référence pS2/TFF1.

Afin de compléter ces études, une autre partie de mes travaux a été de développer un système de purification des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  dans la cellule. Le but de cette stratégie est de comparer les complexes protéiques associés au RE $\alpha$  complexé à l'oestradiol ou activé par l'IGF-I. Cette stratégie permettra aussi de comparer la composition des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  lorsqu'il est complexé soit à l'oestradiol, soit au Tamoxifène, soit au Fulvestrant. Cela afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$ .

# RESULTATS

## **Partie I : Dialogue entre le récepteur des oestrogènes $\alpha$ et le facteur de croissance IGF-I dans l'activation transcriptionnelle des cellules cancéreuses mammaires**

Le fait que les oestrogènes stimulent la prolifération des cellules cancéreuses mammaires a mené au développement de thérapies anti-hormonales. Ces traitements sont basés sur l'utilisation de molécules ayant des effets antagonistes des oestrogènes. La molécule la plus utilisée actuellement est l'antagoniste mixte Tamoxifène. Le traitement des patientes par ce médicament bloque l'effet proliférateur des oestrogènes dans les tumeurs hormono-dépendantes pour leur croissance. Malheureusement, chez les patientes métastatiques, on observe systématiquement l'apparition de résistances à ce type de thérapies dans les 3 ans suivant le début du traitement. L'apparition de cette résistance peut être due à plusieurs mécanismes, parmi lesquels : activation constitutive du  $RE\alpha$ , inversion de l'activité antagoniste du Tamoxifène ou bien suractivation des voies de transduction de signal qui court-circuiteraient l'effet des antagonistes. Des mutations du  $RE\alpha$  provoquant une activation ligand indépendante constitutive sont dans un faible nombre de cas (<1%) à l'origine de ces résistances. Il a été montré que la surexpression du récepteur à activité tyrosine kinase HER-2 (récepteur de la famille des récepteurs à l'EGF) s'accompagne systématiquement d'une résistance au Tamoxifène (Schiff et al., 2004). Toutefois des études cliniques en cours contestent cette observation et des investigations supplémentaires sont nécessaires.

La surexpression du récepteur HER-2 est observée chez 15% des patientes résistantes au Tamoxifène (Ellis, 2004). Des études *in vitro* (Shou et al., 2004) et précliniques ont clairement démontrées que la Gefitinibin, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de ce récepteur, rétablit l'activité anti-proliférative du Tamoxifène. L'herceptine, un anticorps qui

cible HER-2 permet aussi de rétablir l'activité de l'anti-hormone. Pour les 80% de cas restants, la cause de la résistance au Tamoxifène reste inconnue. Des observations cliniques récentes montrent qu'en traitant les patientes avec des molécules ciblant des points de croisement de voies de signalisation des facteurs de croissance (inhibiteurs de prénylation, analogues de la rapamycine), on peut reverser, au moins en partie la résistance au Tamoxifène. Il est donc possible que la résistance au Tamoxifène soit un phénomène adaptatif qui mette en particulier en jeu des modifications épigénétiques. L'activité agoniste/antagoniste du Tamoxifène semble régulée par le rapport de co-activateurs SRC1/SRC3 dans la cellule (Shang and Brown, 2002). L'état de phosphorylation du RE $\alpha$  de ses co-activateurs (Bunone et al., 1996; Chen et al., 2002; Kato et al., 1995) ainsi que de facteurs de transcription tels que AP-1 est également critique pour la réponse aux œstrogènes. L'altération du dialogue entre les voies de signalisation par les oestrogènes et les facteurs de croissance pourrait être à l'origine de l'acquisition de la résistance au Tamoxifène.

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire est de contribuer à l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue entre les voies de signalisation par les œstrogènes et par les facteurs de croissance dans la cellule cancéreuse mammaire. Nous nous sommes intéressés au facteur de croissance IGF-I car c'est un facteur impliqué dans le développement normal de la glande mammaire (Ruan and Kleinberg, 1999) et sa dérégulation peut être la cause du développement de tumeurs mammaires (Lee and Yee, 1995) ou d'apparition de résistance aux anti oestrogènes (Nicholson and Gee, 2000).

**Publication: “Estrogen receptor and the AP1 complex cooperate during IGF-I- induced transcriptional activation of the pS2TFF1 gene”**

L'effet œstrogène de l'IGF-I a été décrit depuis de nombreuses années (voir l'introduction de ce manuscrit et (Vignon et al., 1987)). Nous nous sommes intéressés au dialogue qui existe entre l'oestradiol et le facteur de croissance IGF-I au niveau des promoteurs des gènes oestrogéno-régulés. Nos études montrent que les éléments de réponse contenus dans ces promoteurs jouent un rôle important dans la réponse au traitement par l'IGF-I. Nous avons montré que l'activation transcriptionnelle du gène pS2/TFF1 par l'IGF-I, dont le promoteur contient un élément de réponse au RE (ERE) et un élément de réponse au complexe AP1 (TRE), requiert le RE $\alpha$  et le complexe AP1. Pour mieux comprendre le rôle des éléments ERE et TRE dans ce phénomène nous avons réalisé des études sur des gènes rapporteurs luciférase dont l'expression est contrôlée par un promoteur contenant uniquement, soit un élément ERE, soit des éléments TRE. Les résultats de ces mesures luciférases, combinées aux études sur l'expression du gène pS2/TFF1, ont permis de montrer que la présence de chacun de ces éléments ERE et TRE était nécessaire pour une coopération efficace entre le complexe AP1 et le RE $\alpha$ .

Nous avons ensuite analysé les mécanismes moléculaires d'activation du gène pS2/TFF1 suite au traitement par l'IGF-I. Nous avons montré que c-Jun, c-Fos ainsi que Brg1 (sous unité du complexe de remodelage ATP dépendant SWI/SNF) étaient recrutés sur le promoteur de ce gène après une heure de stimulation par l'IGF-I, tandis que le recrutement du RE $\alpha$  sur le même promoteur est plus tardif (après 3 heures de traitement par l'IGF-I). Par ailleurs, le maximum de phosphorylation de c-Jun est obtenu après 3 heures de stimulation par l'IGF-I, ce qui coïncide avec une forte interaction de c-Jun avec le RE $\alpha$ . Cela nous a permis de proposer un modèle moléculaire de coopération entre le RE $\alpha$  et le complexe AP1

après stimulation par l'IGF-I. Dans un premier temps, le traitement par l'IGF-I induit une phosphorylation rapide du complexe AP1 et déclenche la néo synthèse de c-Jun et c-Fos. Le complexe AP1 lie ensuite le promoteur du gène pS2/TFF1 et recrute le facteur Brg1 qui permettra le remodelage de la chromatine de ce promoteur et facilitera le recrutement des acteurs de la transcription. Enfin, lorsque le taux de c-Jun et sa phosphorylation atteignent un maximum, le RE $\alpha$  est recruté sur le promoteur de pS2/TFF1, grâce à son interaction avec c-Jun, permettant un maintien efficace de la transcription du gène pS2/TFF1 dans le temps.

# Estrogen Receptor $\alpha$ and the Activating Protein-1 Complex Cooperate during Insulin-like Growth Factor-I-induced Transcriptional Activation of the pS2/TFF1 Gene\*

Received for publication, October 27, 2006, and in revised form, February 17, 2007. Published, JBC Papers in Press, February 22, 2007, DOI 10.1074/jbc.M610079200

Sylvain Baron<sup>‡</sup>, Aurélie Escande<sup>§</sup>, Géraldine Albérola<sup>‡</sup>, Kerstin Bystricky<sup>‡</sup>, Patrick Balaguer<sup>§</sup>, and Hélène Richard-Foy<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, UMR 5099 CNRS/Université Paul Sabatier, IFR109, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France and <sup>§</sup>INSERM U540, 60 rue de Navacelles, 34090 Montpellier, France

Insulin like growth factor I (IGF-I) displays estrogenic activity in breast cancer cells. This activity is strictly dependent on the presence of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). However the precise molecular mechanisms involved in this process are still unclear. IGF-I treatment induces phosphorylation of the AF1 domain of ER $\alpha$  and activation of estrogen regulated genes. These genes are characterized by important differences in promoter architecture and response element composition. We show that promoter structure is crucial for IGF-I-induced transcription activation. We demonstrate that on a complex promoter such as the pS2/TFF1 promoter, which contains binding sites for ER $\alpha$  and for the activating protein-1 (AP1) complex, transcriptional activation by IGF-I requires both ER $\alpha$  and the AP1 complex. IGF-I is unable to stimulate transcription of an estrogen-regulated gene under the control of a minimal promoter containing only a binding site for ER $\alpha$ . We propose a molecular mechanism with stepwise assembly of the AP1 complex and ER $\alpha$  during transcription activation of pS2/TFF1 by IGF-I. IGF-I stimulation induces rapid phosphorylation and an increase in protein levels of the AP1 complex. Binding of the phosphorylated AP1 complex to the pS2/TFF1 promoter allows recruitment of the chromatin remodeling factor Brg1 followed by binding of ER $\alpha$  via its interaction with c-Jun.

Control of breast cancer cell proliferation is a complex, multifactorial, and interactive process. Estradiol, a steroid hormone, which acts via its nuclear receptors (ER $\alpha^2$  and  $\beta$ ) and growth factors such as insulin-like growth factor I (IGF-I) or IGF-II, epidermal growth factor, or transforming growth factor  $\alpha$ , whose action is mediated by

tyrosine kinase transmembrane receptors, controls gene expression and cellular proliferation of breast cancer cells (1). Although it was discovered more than 10 years ago that ER $\alpha$  could be activated in a ligand-independent fashion by growth factors like epidermal growth factor or IGF (2), the cross-talk between estrogens and growth factor pathways remains to be elucidated.

In the classical model of ER action, the receptor binds as a homodimer (3) or a heterodimer (4–7) to estrogen response elements (EREs) within the promoters of estrogen-responsive genes. Once present on the promoter of estrogen responsive genes, ER recruits an array of transcriptional cofactors (coactivators and corepressors) that bind to the receptor and interact with other transcription factors, including components of the general transcription machinery. Some of these cofactors possess chromatin-remodeling activities or histone modifying activities or recruit additional proteins to the complex to mediate transcription (for review, see Ref. 8). ER $\alpha$  may also modulate transcription without receptor-DNA interaction by functional interference with other transcription factors such as activating protein-1 (AP1) (for review, see Refs. 9–12).

The AP1 complex, which is implicated in diverse cellular processes, including differentiation, cell proliferation, and transformation (for review, see Ref. 13), predominantly consists of various combinations of Jun (c-Jun, JunB, JunD) and Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) proteins. This complex can result from many different combinations of heterodimers and homodimers, and the combination determines the genes that are regulated by AP1 (14, 15). The AP1 complex formed of heterodimers or homodimers of Jun and Fos proteins has DNA binding activity via the TPA-responsive elements (TREs).

Furthermore transcriptional activity of the AP1 complex is post-translationally regulated by several kinases. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 phosphorylate c-Fos on threonines 325 and 331. These phosphorylations regulate the transforming activity of c-Fos (16). Moreover, phosphorylation of c-Jun by c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases on residues serine 63 (17) and 73 potentiates its ability to activate transcription either as a homodimer (18, 19) or a heterodimer together with c-Fos.

Activation of the IGF-I receptor by IGF-I binding leads to a conformational change of its receptor, the auto phosphorylation of a tyrosine residue in the intracellular part of the receptor, and the subsequent activation of downstream signaling molecules. Then the IGF-I receptor is able to bind signaling

\* This work was supported by la Ligue Nationale Contre le Cancer, la Fondation pour la Recherche Médicale, l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Ligue du Tarn et Garonne, la Ligue Midi-Pyrénées, and l'Institut National du Cancer. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-561-33-59-40; Fax: 33-561-33-58-86; E-mail: hrfoy@ibcg.biotoul.fr.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: ER $\alpha$ , estrogen receptor  $\alpha$ ; ICI for ICI 182,780 or Fulvestrant; E2, 17- $\beta$ -estradiol; IGF-I, insulin-like growth factor I; TPA, phorbol 12-myristate 13-acetate; ERE, estrogen response element; TRE, TPA response element; ChIP, chromatin immunoprecipitation; AP1, activating protein-1; IRS1, insulin receptor substrate 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; siRNA, small interfering RNA; FAM, 6-carboxyfluorescein.



adaptor proteins like insulin receptor substrate 1 (IRS1) and Shc, linking the receptor to downstream signaling pathways like the phosphatidylinositol 3-kinase and the mitogen-activated protein pathways (for review, see Ref. 20). Growth factors such as IGF-I are able to elicit estrogenic responses in target tissues in the absence of estradiol, and they cooperate with the hormone in its presence (21). Several studies have demonstrated that estradiol, anti-estrogens, and growth factors induce a rapid hyperphosphorylation of ER $\alpha$  on serine 118, located at the N terminus within transcriptional activation function AF-1 (2, 22, 23). This phosphorylation is essential for activation of ER $\alpha$  bound or not to its ligand (24). However, this phosphorylation is not sufficient to elicit estrogenic responses in the absence of hormone, and there may be other ER $\alpha$  domains or partners that fulfill additional requirements for growth factor signaling through ER $\alpha$  (22). Supporting this, MCF7 breast cancer cells with a constitutively active MEK1 show increased interaction between ER $\alpha$  and its coactivators (SRC2 and SRC3) and hormone hypersensitivity (25). In addition, phosphatidylinositol 3-kinase, which is activated by IGF-I, has been shown to phosphorylate ER $\alpha$  on serine 167 within 1 h after treatment with growth factors. Active phosphatidylinositol 3-kinase increases the transcription-stimulating activity of both the AF-1 and AF-2 domains of ER $\alpha$ , whereas active protein kinase B (PKB), a downstream target of phosphatidylinositol 3-kinase, only increases the activity of AF-1, suggesting that phosphatidylinositol 3-kinase utilizes PKB-dependent and -independent pathways in activating ER $\alpha$ . In addition, LY294002, a specific inhibitor of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway, reduced phosphorylation of ER $\alpha$  *in vivo* (26).

The goal of the present study was to better understand the cross-talk between the IGF-I and estradiol pathways at the molecular level. We studied the pS2/TFF1 gene whose regulation serves as a paradigm for estrogen regulation of gene expression in breast cancer cells. The pS2/TFF1 gene has a composite promoter with an ERE (located between -405 and -393) and a TRE (AP1 response element, located between -338 and -332), and it has been reported that its activation can be achieved by estradiol or IGF-I (27). Our laboratory has shown that both estradiol and IGF-I treatments induce a rapid chromatin remodeling of the pS2/TFF1 promoter in a region encompassing the ERE and the TRE (28). The role of the AP1 element in the response of pS2/TFF1 to estradiol has been analyzed in detail by others in a cell line derived from the HepG2 hepatocarcinoma cell line, re-expressing ER $\alpha$ . They demonstrate that the ERE is essential for the response of pS2/TFF1 to estrogens and that the TRE is involved in both estrogen and phorbol-ester responses (29).

Here we demonstrate that activation of ER $\alpha$  induced by IGF-I is not sufficient to allow activation of a minimal estrogen-regulated promoter containing only an ERE sequence. We show that in response to IGF-I treatment, the AP1 complex is phosphorylated and rapidly recruited to the pS2/TFF1 promoter, whereas recruitment of ER $\alpha$  is delayed. On the pS2/TFF1 promoter, ER $\alpha$  and the AP1 complex cooperate during IGF-I-induced activation of the transcription, but have different functions. The AP1 complex is implicated in chromatin remodeling

by recruiting chromatin-remodeling factors such as Brg1, whereas ER $\alpha$  is involved in later stages of transcription.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Chemicals**—Estradiol was purchased from Sigma. ICI 184780 (Fulvestrant) was purchased from Zeneca Pharmaceuticals. IGF-I was purchased from Euromedex.

**Antibodies**—Anti-human ER $\alpha$  (HC20), anti-Brg1 (H-88), anti-phospho-c-Jun (KM-1), anti-c-Jun (sc-45), and anti-c-Fos (H-125) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-c-Fos and anti-phospho-Thr-325 (ab27793) were purchased from Abcam. Anti-GAPDH was purchased from Chemicon International.

**Cell Lines and Tissue Culture**—MCF7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 containing 50  $\mu$ g/ml gentamycin and 10% heat-inactivated fetal calf serum at 37 °C in a humidified atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub>.

The stably transfected luciferase reporter MELN and MTLN cell lines were obtained as previously described (30). Briefly, to obtain MELN cells, ER $\alpha$ -positive breast cancer MCF-7 cells were transfected with the estrogen-responsive gene ERE-bGlob-Luc-SV-Neo (31). To obtain MTLN cells, MCF-7 cells were co-transfected with the AP1-responsive gene TRE<sub>3</sub>-Tk-Luc and the neomycin resistance gene pSV2-Neo (32). Selection of resistant clones by Geneticin was performed at 1 mg/ml. MELN and MTLN cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 containing 50  $\mu$ g/ml gentamycin, 10% heat-inactivated fetal calf serum, and 1 mg/ml G418 at 37 °C in a humidified atmosphere containing 10% CO<sub>2</sub>.

To study the effects of estrogens and IGF-I, cells were grown for 2 days in media without phenol red without gentamycin and without serum. Cells were treated or not with 10 nM estradiol (E2), 5 nM IGF-I, or 100 nM Fulvestrant for the indicated times.

**Luciferase Assays**—Cells were grown in 3.5-cm diameter dishes and treated as indicated in the figure legends. Cells were then lysed in 200  $\mu$ l or Promega lysis buffer and frozen. Luciferase activity was determined using the Luciferase assay reagent (Promega E397A) on a Centro LB 960 (Berthold). Luciferase activities were normalized to plated cell number or to total protein content measured by the Amido Schwarz technique (33). All experiments were performed at least in triplicate, and S.D. were calculated.

**Western Blots**—Western blots were performed as previously described (34). The quantity of extract loaded on the gels was normalized to total protein content, assayed by the Amido Schwarz technique. All antibodies were used at a 1/200 dilution, except for anti-phospho-c-Fos antibody, in which the dilution was 1/1000.

**ChIP Experiments**—Cells were grown to 95% confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum followed by 48 h in serum and phenol red-free media. After the addition of hormone or growth factor, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and cross-linked with 1.5% formaldehyde at 37 °C for 5 min. Cells were then rinsed twice with ice-cold PBS, collected into 100 mM Tris-HCl, pH 9.4, and 10 mM dithiothreitol, incubated for 15 min at 30 °C, and centrifuged for 5 min at 2000  $\times$  g. Cells were washed sequentially with 1 ml of ice-cold PBS, buffer I (0.25% Triton X-100, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA,

## IGF-I-induced Activation of the pS2/TFF1 Gene

10 mM HEPES, pH 6.5), and buffer II (200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 6.5). Cells were then resuspended in 0.3 ml of lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1× protease inhibitor mixture (Roche Applied Science)) and sonicated three times for 15 s with a Branson Sonifier 250 (duty cycle 50%, output control 5) followed by centrifugation for 10 min. Supernatants were collected and diluted in buffer (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1) followed by immuno-clearing with 2 μg of sheared salmon sperm DNA, 20 μl of preimmune serum, and protein A-Sepharose (45 μl of 50% slurry in 10 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM EDTA) for 2 h at 4 °C. Immunoprecipitation was performed overnight at 4 °C with specific antibodies. After immunoprecipitation, 100 μl of protein A-Sepharose and 2 μg of salmon sperm DNA were added, and the incubation was continued for another 1 h. Precipitates were washed sequentially for 10 min each in TSE I (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl), TSE II (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl; except for Brg1, where SDS was removed from the buffer), and buffer III (0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1). Precipitates were then washed 3 times with Tris-EDTA buffer and extracted with 1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> for 30 min at 65 °C. Eluates were heated at 65 °C overnight to reverse the formaldehyde cross-linking. After cross-link reversion, 1/3 of the DNA fragments were purified with a GenElute PCR clean-up kit (Sigma), and 1/20 of the purified DNA was quantified by quantitative PCR. Quantitative PCR were performed on an iCycler (Bio-Rad) using the oligonucleotides PS2 CH1 (5'-GGCCATCTCTCACTATGAATCACTTCTGC-3') and PS2 CH2 (5'-GGCAGGCTCTGTTTGCTTAAAGAGCG-3') to amplify the pS2/TFF1 promoter fragment. Amplification conditions were 3 min at 95 °C followed by 50 cycles (20 s at 95 °C, 30 s at 62.5 °C, 20 s at 72 °C). For the purification of the inputs, 20 μl of extract was removed and heated overnight at 65 °C, DNA was then purified as for immunoprecipitates, and 1/20 of the DNA was quantified by quantitative PCR.

**Co-immunoprecipitations**—For co-immunoprecipitations of cross-linked protein complexes, 1 × 10<sup>6</sup> cells were submitted to immunoprecipitation as in the ChIP procedure, except that after immuno-recovery proteins were eluted by the addition of 30 μl of H<sub>2</sub>O and 10 μl of 4× electrophoresis loading buffer (200 mM Tris, pH 6.8, 8% SDS, 20% glycerol, 8 mM EDTA, 6% β-mercaptoethanol, 0.016% bromphenol blue). The totality of the immunoprecipitated material was electrophoresed on SDS gels and analyzed by Western blotting.

For co-immunoprecipitations of native protein complexes, 1 × 10<sup>6</sup> MCF7 cells, grown for 3 days in steroid-free medium, were washed twice in PBS, resuspended in 500 μl of lysis buffer (50 mM Tris, pH 8, 0.4% Nonidet P-40, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, anti-protease from Roche Applied Science (1 mini-tablet/10 ml)), phosphatase inhibitors from Sigma (P2850), and incubated for 15 min at 4 °C. After centrifugation for 20 min at 16,000 × g, the lysate was adjusted to 1 ml with 500 μl of dilution buffer (50 mM Tris, pH 8, 0.4% Nonidet P-40, 2.5 μM CaCl<sub>2</sub>, 1 μl of DNase I). A total of 40 μl (v/v) of protein A/protein G beads were added, and the lysate was incubated for 45 min at

4 °C on a rotating wheel. The supernatant was collected by centrifugation, 30 μl was withdrawn for input assays, and the remaining material was incubated with 1 μg of anti-c-Jun for 2 h at 4 °C on a rotating wheel. A total of 20 μl (v/v) protein A/protein G beads were added again, and the incubation was continued for 2 more hours. Beads were washed 3 times with wash buffer (50 mM Tris, pH 8, 0.4% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), and proteins were eluted by the addition of 20 μl of H<sub>2</sub>O and 10 μl of 4× electrophoresis loading buffer (200 mM Tris, pH 6.8, 8% SDS, 20% glycerol, 8 mM EDTA, 6% β-mercaptoethanol, 0.016% bromphenol blue). The totality of the immunoprecipitated material was electrophoresed on SDS gels and analyzed by Western blotting.

**RT-PCR Experiments**—Cells were rinsed twice in ice-cold 1× PBS, RNA was then purified using the RNeasy mini kit (Qiagen). RNA was eluted in 100 μl of RNase-free water, and 1/20 was submitted to quantitative RT-PCR (Platinum RT-PCR thermoscript one step, Invitrogen) with the following primers: pS2/TFF1, 5'-GTACACGGAGGCCAGACAGAGACGTG(FAM)AC-3' (forward) and 5'-AGGGCGTGACACCA-GGAAA-3' (reverse); actin, 5'-CACAATAGTCCTCGGCCA-CATTG(FAM)G (reverse) and 5'-GGTGACAGCAGTCGGT-TGGA-3' (forward); GAPDH, 5'-GACCATTGCTGGGGCTG-GTGGTC(FAM)C-3' (reverse) and 5'-ACAGCAACAGGGT-GGTGGAC-3' (forward). Amplification conditions were 30 min at 45 °C and 3 min at 95 °C followed by 50 cycles (20 s at 95 °C, 30 s at 63 °C, 20 s at 72 °C).

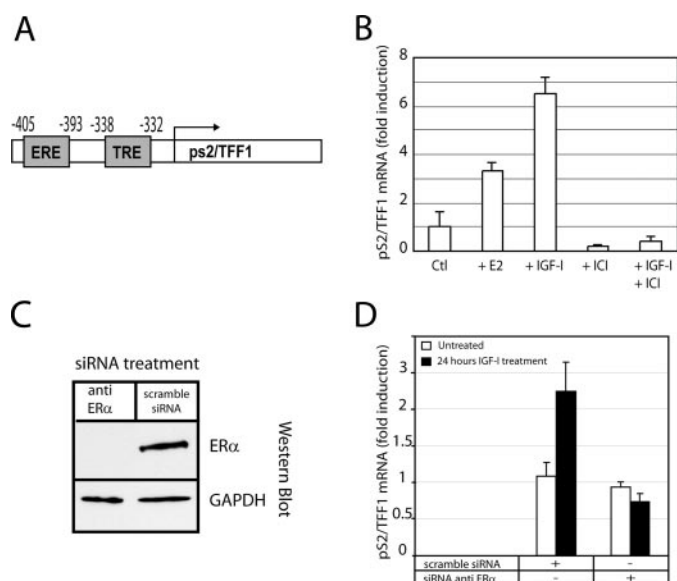
**Cell Electroporation and RNA Interference**—Five million cells were electroporated by siRNA to a final concentration of 20 μM. Cells were electroporated on a gene pulser Xcell (Bio-Rad) at 250 V and 960 microfarads in 0.4-mm cuvettes. After electroporation, cells were plated and grown for 2 days in media without phenol red, without gentamycin, and without serum. Cells were treated or not with 5 nM IGF-I for 1 day.

siRNA-directed against c-Jun, c-Fos, and ERα were purchased from Dharmacon (siRNA, c-Jun M-003268-02, c-Fos M-003265-01, and ERα M-003401-02). Scramble siRNA, which does not recognize any human mRNA, was purchased from Eurogentec (CAUGUCAUGUGUCAUCUdTdT) and used as a negative control.

## RESULTS

**IGF-I-induced Activation of the pS2/TFF1 Gene Requires Both ERα and the AP1 Complex**—IGF-I is an activator of estrogen-regulated genes in breast cancer cells (21). It promotes chromatin remodeling at the promoter of the estrogen-regulated gene pS2/TFF1 (28). However, its mechanism of action is not elucidated, and it is not known whether the architecture of the promoter is important for this activation. This gene has a complex promoter that contains one binding site for the ERE and one binding site for the AP1 complex (TRE) (Fig. 1A). We first determined the importance of these two transcription factors in IGF-I-induced activation of the pS2/TFF1 gene. As previously described (21) in MCF7 cells, IGF-I alone induced transcriptional activation of the estrogen-regulated gene pS2/TFF1 (Fig. 1B). To assess the importance of ERα in this activation, we treated cells both with IGF-I and the pure antiestrogen Fulvestrant (ICI 182 780). When bound to Fulvestrant, ERα is rapidly

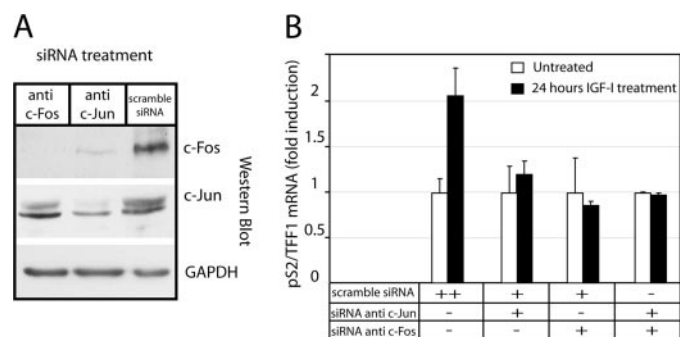




**FIGURE 1. IGF-I-induced activation of the pS2/TFF1 gene is mediated by ER $\alpha$ .** *A*, schematic representation of the estrogen-regulated promoter of the pS2/TFF1 gene showing the localization of the ERE and TRE. *B*, MCF7 cells were treated for 19 h with either vehicle (Ctl), E2, IGF-I, Fulvestrant (ICI), or a combination of IGF-I and Fulvestrant. RNA was purified and pS2/TFF1 mRNA content was quantified by real time RT-PCR. Results were normalized to actin mRNA expression levels. All experiments were performed in triplicate, and S.D. was calculated. *C* and *D*, MCF7 cells were electroporated with the indicated siRNA to a 20  $\mu$ M final concentration, incubated for 48 h in phenol red-free and serum-free media, and treated or not for 24 h with IGF-I. *C*, cells were lysed, and 5  $\mu$ g of total cell extract was blotted with anti-ER $\alpha$  or anti-GAPDH antibodies. *D*, RNA was purified from the cells, and pS2/TFF1 mRNA levels were quantified by real time RT-PCR. Results are expressed as induction of RNA relative to those in cells untreated with IGF-I. Results were normalized to actin mRNA expression levels. The bars indicate mean errors of experiments performed in duplicate.

degraded in the nucleus (35, 36) and consequently never binds DNA (37). Here we found that Fulvestrant blocked the IGF-I-induced transcription of pS2/TFF1 (Fig. 1*B*) confirming that ER $\alpha$  is necessary for IGF-I-induced transcription of this promoter (27). To go further in the role of ER $\alpha$  in IGF-I mediated activation of the pS2/TFF1 gene, we knocked down ER $\alpha$  using siRNAs directed against ER $\alpha$  mRNA. MCF7 cells were then stimulated by IGF-I or not for 24 h, and RNA was purified. The specificity of siRNA depletion was analyzed by Western blot (Fig. 1*C*) and showed that siRNA directed against ER $\alpha$  mRNA caused a specific and dramatic decrease in ER $\alpha$  protein levels compared with scramble siRNA. The administration of ER $\alpha$  siRNA to MCF7 cells abolished the IGF-I-mediated activation of the pS2/TFF1 gene compared with cells electroporated by scramble siRNA (Fig. 1*D*). This result reinforces the results obtained with Fulvestrant and demonstrates that ER $\alpha$  is required for IGF-I-mediated activation of the pS2/TFF1 gene.

To evaluate the importance of c-Jun and c-Fos for the pS2/TFF1 activation mediated by IGF-I, we knocked down the two proteins using siRNAs directed against c-Jun or c-Fos mRNA. They were administrated to MCF7 cells separately or in combination. Cells were then stimulated or not by IGF-I, and RNA was purified. The effect of siRNA depletion of c-Jun and c-Fos was analyzed by Western blot (Fig. 2*A*). SiRNA directed against c-Fos was able to specifically lower c-Fos protein levels, whereas siRNA directed against c-Jun lowered both c-Jun and



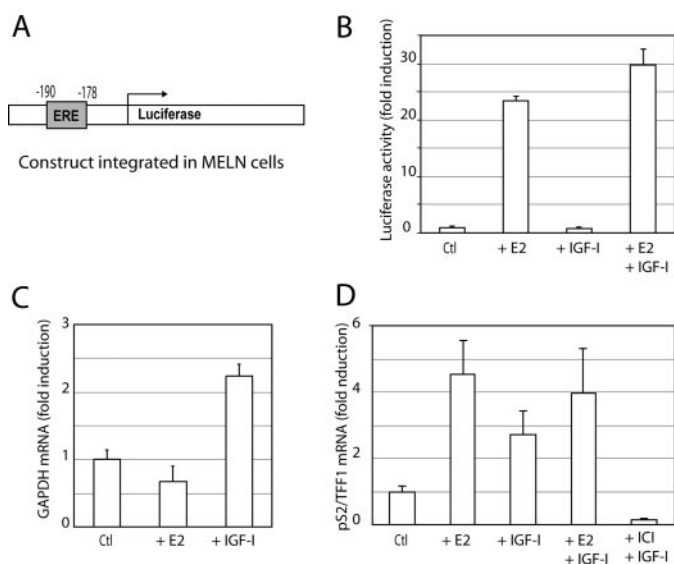
**FIGURE 2. Both c-Jun and c-Fos are necessary for IGF-I-induced pS2/TFF1 transcription activation.** MCF7 cells were electroporated with the indicated siRNA, incubated for 48 h in phenol red-free and serum-free media, and treated 24 h or not by IGF-I. *A*, cells were lysed, and 100  $\mu$ g of total cell extract was blotted with anti-c-Jun, anti-c-Fos, or anti-GAPDH antibodies. *B*, RNA was purified from the cells, and pS2/TFF1 mRNA levels were quantified by real time RT-PCR. Results are expressed as induction of RNA relative to the untreated cells. ++ represents a 20  $\mu$ M final concentration of siRNA, and + represents a 10  $\mu$ M concentration of siRNA. Results were normalized to actin mRNA expression levels. The bars indicate mean errors of experiments performed in duplicate.

c-Fos protein levels. Lowering the protein level of a transcription factor involved in the formation of heterodimers often induces a decrease in partner protein levels. Moreover in the case of the AP1 complex, c-Jun is able to homodimerize, preventing its degradation when c-Fos protein levels are lowered. c-Jun and c-Fos siRNA have a clear effect on pS2/TFF1 activation mediated by IGF-I (Fig. 2*B*), dramatically impairing its activation compared with cells electroporated with the scramble siRNA. Treatment of cells with both siRNAs also abolished IGF-I-mediated activation of the pS2/TFF1 gene. These results demonstrate that both ER $\alpha$  c-Jun and c-Fos are essential for IGF-I action and that in the cell the absence of one these proteins cannot be compensated by the presence of other members of their respective families.

**Activation of Estrogen-regulated Genes by IGF-I Requires a Composite Promoter**—We have shown that both ER $\alpha$  and the AP1 complex are required for IGF-I-mediated activation of the pS2/TFF1 gene. To better understand the role of each of the two promoter elements (ERE and TRE) in this transcriptional activation, we used the MELN cell line that has been derived from MCF-7 cells and engineered to express the reporter gene luciferase under the control of a synthetic promoter containing only an ERE upstream of a minimal  $\beta$ -globin promoter (Fig. 3*A*). These cells were untreated or treated with estradiol and IGF-I alone or in combination, and induction of luciferase, GAPDH mRNA, and pS2/TFF1 mRNA were measured. Fig. 3*B* shows a robust induction of luciferase activity by estradiol, whereas IGF-I had no effect. The increase in GAPDH gene expression (a gene known to be induced by IGF-I (38)) after treatment of the MELN cells by IGF-I (Fig. 3*C*) demonstrates that the IGF-I pathway is not impaired in this cell line. This was further confirmed by the induction of the endogenous pS2/TFF1 gene by estradiol as well as by IGF-I in the MELN cell line (Fig. 3*D*). These results indicate that IGF-I treatment is not sufficient to promote the activation of a promoter containing a single ERE.

To investigate the importance of the TRE element in IGF-I-mediated activation of pS2/TFF1, we used a cell line engineered

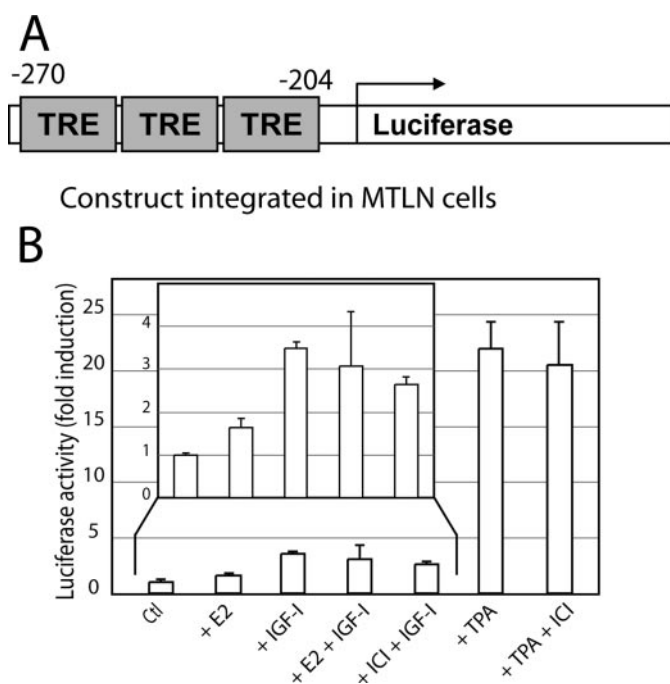
## IGF-I-induced Activation of the pS2/TFF1 Gene



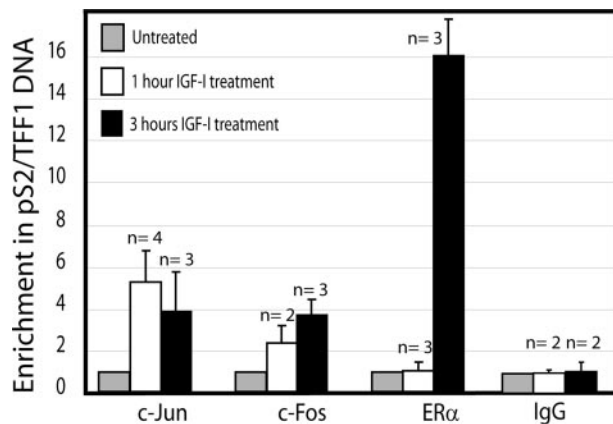
**FIGURE 3. IGF-I-activated ER $\alpha$  is unable to stimulate transcription of an estrogen-regulated gene with a minimal promoter containing only a unique ERE.** *A*, schematic representation of the estrogen-regulated minimal promoter driving the luciferase gene integrated in MELN cells and showing the localization of the ERE. *B*, MELN cells were grown for 48 h in the presence of 100 nM Fulvestrant. Cells were rinsed and treated for 24 h with either vehicle (Ctl), E2, IGF-I, or a combination of E2 and IGF-I. Luciferase activity was measured, and the results were normalized to the number of cells. *C*, MELN cells were treated for 19 h with either vehicle (Ctl), E2, or IGF-I. RNA was purified, and GAPDH mRNA content was quantified by real time RT-PCR. Results were normalized to actin mRNA expression levels. *D*, MELN cells were treated for 19 h with either vehicle (Ctl), E2, IGF-I, Fulvestrant, or a combination of IGF-I and E2. RNA was purified, and pS2/TFF1 mRNA content was quantified by real time RT-PCR. Results were normalized to mRNA actin expression levels.

to express luciferase under the control of a promoter containing TREs, which are recognized by the AP1 complex (Fig. 4A). In this experiment we used TPA, which is a well known inducer of the AP1 complex (39, 40) as a positive control. Upon IGF-I treatment of the cells, luciferase activity was induced 3-fold when compared with untreated cells (Fig. 4B). We conclude that IGF-I can activate a minimal promoter containing TRE elements. Concomitant treatment of the cells with either IGF-I or TPA and Fulvestrant or estradiol did not change the level of activation of luciferase compared with cells treated with IGF-I or TPA alone (Fig. 4B, compare lanes +TPA with +TPA +ICI and lanes +IGF-I with +E2 +IGF-I and with +ICI +IGF-I). This result demonstrates that the effect of Fulvestrant on the activation of the pS2/TFF1 gene by IGF-I (see Fig. 1B) is not due to a defect in the signal transduction pathway mediated by IGF-I in the presence of Fulvestrant. This also demonstrates that AP1-mediated activation of TRE<sub>3</sub>-Tk-Luc promoter is independent of ER $\alpha$  action. Taken together, these results indicate that ER $\alpha$  is able to cooperate with the AP1 complex to promote transcription on composite promoters such as pS2/TFF1 and that promoter architecture is crucial for the cooperation between the AP1 complex and ER $\alpha$ .

*The AP1 Complex Binding Precedes the Association of ER $\alpha$  on the pS2/TFF1 Promoter after IGF-I Stimulation*—These data raise the question of the exact role of ER $\alpha$  and the AP1 complex in pS2/TFF1 activation upon IGF-I stimulation. In the context of estrogen-stimulation, ER $\alpha$  is recruited precociously to the pS2/TFF1 promoter, and it plays a central role in triggering transcription of the pS2/TFF1 gene (37). We wondered if in the



**FIGURE 4. IGF-I induces the activation of a promoter containing a minimal TRE.** *A*, schematic representation of the promoter driving the luciferase gene integrated in MTLN cells, showing the TREs. *B*, MTLN cells were treated for 24 h with either vehicle (Ctl), E2, IGF-I, TPA, and Fulvestrant or in combination. Luciferase activity was measured and normalized to protein content. Results are expressed as induction compared with the untreated control.



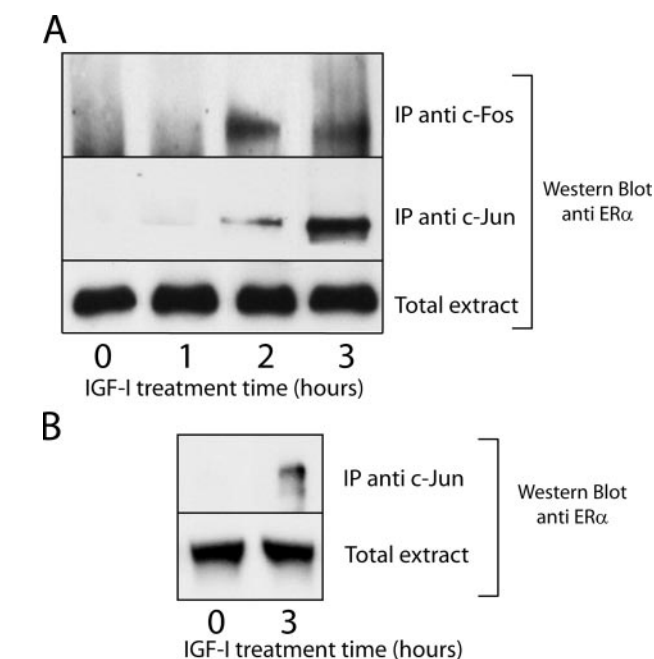
**FIGURE 5. c-Jun and c-Fos are recruited earlier than ER $\alpha$  on the pS2/TFF1 promoter.** MCF7 were treated for 1 or 3 h with either vehicle (Ctl), E2, or IGF-I and submitted to the chromatin immunoprecipitation procedure. The amount of pS2/TFF1 promoter co-immunoprecipitated with anti-ER $\alpha$ , anti-c-Jun, anti-c-Fos, or anti-IgG antibodies was quantified by real time PCR. The quantification of the number of independent experiments is shown (n). Results are expressed as the -fold enrichment in DNA compared with the untreated cells fixed arbitrarily to 1. When n = 3, the bars represent S.D., and when n = 2 they represent the mean error.

case of IGF-I stimulation the situation was similar. Who triggers transcription, the AP1 complex or ER $\alpha$ ? To answer this question we performed ChIP experiments in which we measured the recruitment of c-Jun, c-Fos, and ER $\alpha$  on the pS2/TFF1 promoter after various treatment times of the cells with IGF-I. Fig. 5 shows that after 1 h of treatment ER $\alpha$  was not recruited to the pS2/TFF1 promoter. On the contrary c-Jun and c-Fos were present on pS2/TFF1. There was a 5-fold increase in c-Jun binding and a 2-fold increase in c-Fos binding to this promoter

compared with the untreated control (Fig. 5). After 3 h of IGF-I stimulation, c-Jun and c-Fos were still present on the pS2/TFF1 promoter roughly to the same extent as after 1 h of treatment. Their binding to DNA was ~4-fold higher than that of the untreated controls. After 3 h of IGF-I stimulation, a strong recruitment of ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter was observed (16-fold more than in the untreated control, Fig. 5). Using the irrelevant anti-IgG antibodies, no enrichment of pS2/TFF1 DNA could be detected in between the different experimental conditions. These results taken together with the fact that IGF-I treatment is not sufficient to promote the activation of a promoter containing a single ERE suggests that the AP1 complex could be the factor recruiting ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter.

**IGF-I Induces Phosphorylation of the AP1 Complex and Promotes Its Interaction with ER $\alpha$** —Results shown above indicate that both ER $\alpha$  and the AP1 complex are recruited to the pS2/TFF1 promoter but with different timing, AP1 complex being recruited earlier than ER $\alpha$ . Therefore, we investigated the mechanisms involved in the delayed interaction of ER $\alpha$  with the pS2/TFF1 promoter and if AP1 complex could be responsible for this recruitment. First we studied the effect of IGF-I stimulation on the physical interaction between ER $\alpha$  and the AP1 complex. It has been previously shown that c-Jun and ER $\alpha$  interact directly in intact cells, forming a protein complex in a ligand-dependent manner (41). However, to date no interaction between ER $\alpha$  and c-Fos has been described. To assess if ER $\alpha$  and the c-Jun-c-Fos complex belong to the same protein complex after exposure to growth factors, we treated MCF7 cells for various times by IGF-I and cross-linked the proteins in whole cells to preserve the integrity of the complexes. This was followed by co-immunoprecipitation using anti-c-Fos and anti-c-Jun antibodies. Western blots using an antibody directed against ER $\alpha$  showed that both c-Jun and c-Fos co-immunoprecipitated with ER $\alpha$  upon stimulation by IGF-I (Fig. 6A). There was no detectable interaction between c-Jun and ER $\alpha$  after 1 h, a weak interaction after 2 h, and a strong interaction after 3 h of IGF-I stimulation. Co-immunoprecipitation of c-Fos and ER $\alpha$  was weaker than that of c-Jun and ER $\alpha$ , also maximal after 3 h of treatment with IGF-I. To get further insights on the interaction between ER $\alpha$  and the AP1 complex, we performed co-immunoprecipitations on native protein complexes under stringent conditions. After 3 h of IGF-I stimulation a clear interaction between ER $\alpha$  and c-Jun could be detected (Fig. 6B), confirming the results obtained on cross-linked complexes and suggesting a strong interaction between these two transcription factors. In contrast, we were unable to detect any interaction between ER $\alpha$  and c-Fos under IGF-I stimulation (data not shown), suggesting that these two proteins, even if they belong to the same complex, as suggested by the cross-linking experiments, probably did not interact directly or have a weak interaction.

IGF-I treatment causes the activation of the mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase pathways, leading to the phosphorylation of many transcription factors and mediators. We then investigated if there was a correlation between the phosphorylation state of AP1 complex and the time course of interaction between AP1 complex and ER $\alpha$ . Fig. 7 shows the effects of IGF-I treatment on the two main proteins implicated in the proliferative action of the AP1 com-



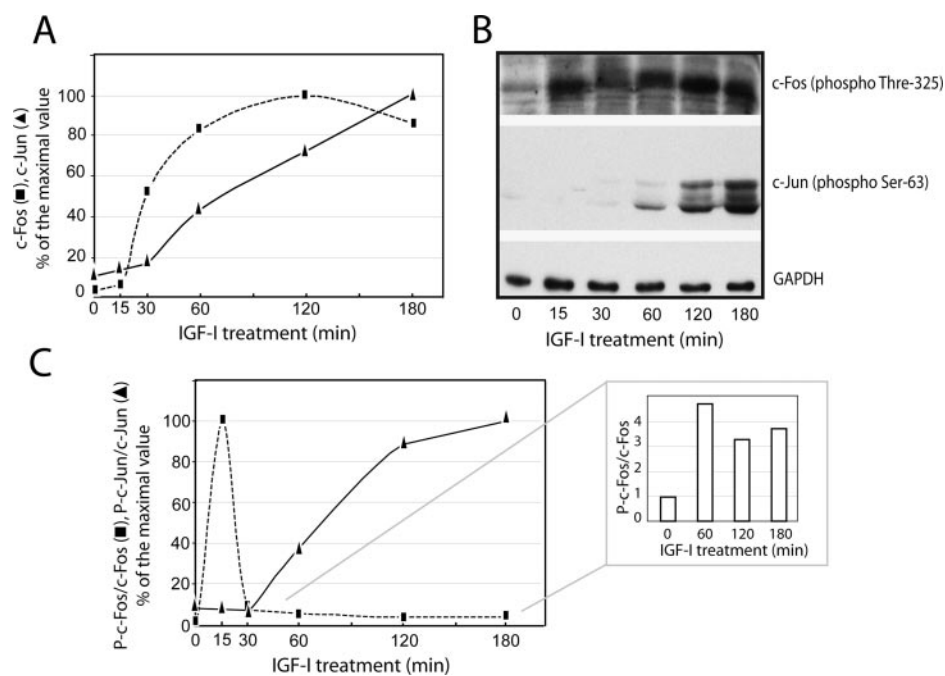
**FIGURE 6. ER $\alpha$  interacts with both c-Jun and c-Fos upon IGF-I treatment.** MCF7 cells were treated for the indicated times with IGF-I. *A*, nuclear extracts containing cross-linked proteins were prepared as for ChIP experiments and immunoprecipitated (IP) with anti-c-Jun or anti-c-Fos antibodies. The presence of ER $\alpha$  in the eluates was analyzed by Western blot using anti-ER $\alpha$  antibody. *B*, native protein complexes were prepared as indicated under "Experimental Procedures" and subjected to immunoprecipitation with anti-c-Jun antibody. The presence of ER $\alpha$  in the eluates was analyzed by Western blot using anti-ER $\alpha$  antibody.

plex, c-Jun and c-Fos. First, the levels of the two proteins were increased (Fig. 7A). The c-Fos concentration increased rapidly, and within 30 min the protein level reached 50% that of its maximal level. The increase in c-Jun was slower, reaching 50% that of its maximal level after 80 min of IGF-I treatment. These results are in agreement with the fact that IGF-I treatment induces an increase of mRNA levels of both c-Jun and c-Fos (42). Second, c-Jun and c-Fos are phosphorylated upon IGF-I treatment of the cells (Fig. 7B). Phosphorylation of c-Fos was rapid, occurring within 15 min and strong on threonine 325 (Fig. 7B), a key residue in c-Fos activation known to be phosphorylated by extracellular signal-regulated kinases (16). This phosphorylation level was maintained over time. Phosphorylation of the c-Jun protein on serine 63 (Fig. 7B), which is located within its transactivation domain, was slower and reached its maximal level after 3 h of treatment with IGF-I.

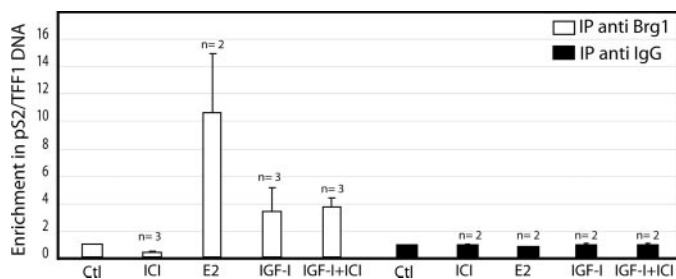
The increase in unphosphorylated and phosphorylated c-Jun and c-Fos levels was quantified from the blots, and the ratio of phosphorylated c-Jun and c-Fos over total c-Jun and c-Fos proteins was calculated. Fig. 7C showed a constant increase, up to 12-fold of the phospho-c-Jun/c-Jun ratio. This indicates that IGF-I induces an increase in both c-Jun protein levels and c-Jun phosphorylation but that phosphorylation increased more than the amount of the protein. For the phospho-c-Fos/c-Fos ratio, a dramatic increase (more than 100-fold) occurred within 15 min after treatment with IGF-I and decreased rapidly. After 2 h of treatment the phospho-c-Fos/c-Fos ratio remained constant and was approximately three times the basal level. This reveals that IGF-I induces rapid phosphorylation of c-Fos more rapidly



## IGF-I-induced Activation of the pS2/TFF1 Gene



**FIGURE 7. IGF-I treatment induces the phosphorylation of both c-Jun and c-Fos.** MCF7 cells were treated with IGF-I for the indicated times. 100  $\mu$ g of total cell extract were resolved by electrophoresis, and blots were revealed with anti-c-Jun or anti-c-Fos antibodies (*panel A*) or anti-phospho-c-Jun, anti-phospho-c-Fos, and anti-GAPDH antibodies (*panel B*). *A*, quantification of total c-Jun and c-Fos levels from the Western blots. *B*, Western blot showing the phosphorylated forms of c-Jun and c-Fos. *C*, ratio of phosphorylated protein over total protein extract; the *inset* represents an enlargement of the phosphorylated c-Fos/c-Fos ratio.



**FIGURE 8. Brg1 is recruited to the pS2/TFF1 promoter after IGF-I stimulation.** MCF7 cells were treated for 1 h with either vehicle (*Ctl*), E2, IGF-I, Fulvestrant, or a combination of IGF-I and Fulvestrant. The amount of pS2/TFF1 promoter DNA co-immunoprecipitated (*IP*) with anti-Brg1 or anti-IgG antibodies was quantified by real time PCR. The quantification of the number of independent experiments is indicated (*n*). Results are expressed as in Fig. 5.

than its synthesis. c-Fos phosphorylation is sustained during its synthesis occurs (Fig. 7, *panel C*, *inset*).

These data indicate that the IGF-I-dependent interaction between the c-Jun complex and ER $\alpha$  correlates with the time course of phosphorylation of c-Jun, suggesting a direct role of c-Jun phosphorylation in the interaction between ER $\alpha$  and the AP1 complex. Moreover this interaction of ER $\alpha$  with c-Jun after 3 h of IGF-I treatment coincides with the phosphorylated state of both c-Jun and c-Fos and a strong recruitment of ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter. We propose, therefore, that the AP1 complex is responsible for the recruitment of ER $\alpha$  to this promoter by IGF-I.

*Chromatin Remodeling of the pS2/TFF1 Gene Activated by IGF-I Is Mediated by Direct Recruitment of Brg1 by AP1*—Our results support a role for the AP1 complex in the recruitment of

ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter upon IGF-I stimulation. However, the precise mechanism is still unknown. We have previously demonstrated in MCF-7 cells that IGF-I treatment induces chromatin remodeling of pS2/TFF1 promoter after 2 h of treatment (28). To assess if the chromatin remodeling of this promoter is due to the recruitment of ER $\alpha$  or of AP1, we analyzed by ChIP the presence of Brg1, a chromatin remodeling factor recruited precociously to the pS2/TFF1 promoter (37). MCF7 cells were treated for 1 h either with estradiol, IGF-I, or Fulvestrant alone or with a combination of IGF-I and Fulvestrant, and we measured the quantities of Brg1 associated to the promoter (Fig. 8). Upon estradiol stimulation, Brg1 was rapidly recruited to the pS2/TFF1 promoter, with a 10-fold enrichment compared with untreated cells. Upon IGF-I stimulation, Brg1 was also recruited to the pS2/TFF1 promoter (4-fold more than in the untreated control),

suggesting that Brg1 may be responsible for IGF-I-induced chromatin remodeling of the pS2/TFF1 promoter. Furthermore co-treatment of the cells with IGF-I and Fulvestrant resulted in a recruitment of Brg1 similar to that obtained by treatment with IGF-I alone. This indicates an ER $\alpha$ -independent recruitment of Brg1 upon IGF-I stimulation. Using the irrelevant anti-IgG antibodies, no enrichment of pS2/TFF1 DNA could be detected in between the different experimental conditions (Fig. 8). These data support a direct role for AP1 via the recruitment of Brg1 in chromatin remodeling of the pS2/TFF1 promoter upon IGF-I stimulation.

## DISCUSSION

*Functional Cooperation between ER $\alpha$  and the AP1 Complex Is Dictated by Promoter Structure*—We have investigated the cross-talk between estradiol and IGF-I signaling pathways in breast cancer cell lines. For this work we used three different kinds of promoters, a complex promoter containing both ER $\alpha$  and AP1 response elements and two minimal promoters, one containing one binding site for ER $\alpha$  and the other containing three binding sites for the AP1 complex. We show that cross-talk between ER $\alpha$  and the AP1 complex is greatly influenced by the structure of the promoter. First, our data, obtained in a cell line derived from MCF-7 cells that express luciferase under the control of a synthetic promoter containing an ERE, demonstrate that IGF-I is unable to stimulate transcription of a gene driven by a promoter containing only an estrogen response element. This result contrasts with a previous report that showed that IGF-I was able to induce the expression of a luciferase reporter transgene driven by a promoter containing two EREs in the uterus

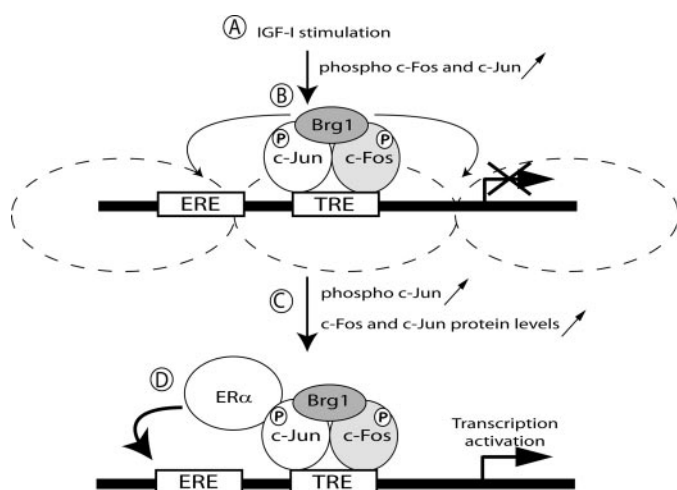
of transgenic mice (43). The difference could be due to an impairment of the IGF-I pathway in cell line MELN. Induction of GAPDH and pS2/TFF1 by IGF-I indicates that this is not the case. Thus, this discrepancy may come from the type of minimal promoter used. For our study we used a reporter gene under the control of the  $\beta$ -globin minimal promoter with an estrogen response element, whereas Klotz *et al.* (43) used the minimal thymidine kinase promoter. Another possibility could be that the promoter used to drive the transgene in mice contains a cryptic AP1 or SP1 response element. In addition, differences may be species-specific (human *versus* mouse) or tissue-specific (breast cancer cells *versus* normal uterus). The use of a cell line containing the luciferase gene under control of TPA response elements (that binds AP1) shows that IGF-I (and phorbol esters) induces luciferase activity and that this induction is not affected by anti-estrogens such as Fulvestrant. This finding confirms a previous report demonstrating that Fulvestrant does not inhibit IGF-I signaling (44) and that on this kind of promoter ER $\alpha$  does not play any role in IGF-I-induced activation of the AP1 complex. Studies on synthetic promoters report that the use of anti-estrogens stimulates AP1 transcriptional activity and that DNA binding activity of ER $\alpha$  is not required for this activation (45). Our studies on the endogenous promoter pS2/TFF1 demonstrate that the molecular mechanisms of cooperation between ER $\alpha$  and AP1 complex differ on endogenous estrogen-regulated promoters. First, a combined treatment of MCF7 cells by IGF-I, which activates the AP1 complex, and Fulvestrant, which blocks ER $\alpha$  action and causes its rapid degradation (35, 36), inhibits pS2/TFF1 transcription. Lowering protein levels of ER $\alpha$  by the use of siRNA in cells treated with IGF-I leads to the same result, demonstrating that ER $\alpha$  is crucial for IGF-I mediated activation of this gene. Moreover, invalidation of the AP1 complex by siRNA also causes loss of IGF-I mediated activation of the pS2/TFF1 gene. These results clearly indicate that on an endogenous promoter like pS2/TFF1 both ER $\alpha$  and AP1 are required for ligand-independent activation of this gene. Furthermore, for full cooperation between these transcription factors after IGF-I stimulation, both AP1 and ER $\alpha$  response elements are required. This suggests that DNA binding activity of both transcription factors is necessary.

*The AP1 Complex and ER $\alpha$  Play Different Roles during Transcription Activation of the pS2/TFF1 Gene*—We have previously described that both estradiol and IGF-I are able to induce chromatin remodeling of pS2/TFF1 promoter (28). Here we show that both estradiol and IGF-I are able to induce recruitment of Brg1 to the pS2/TFF1 promoter. In the presence of estradiol, ER $\alpha$  may recruit Brg1. Upon IGF-I treatment, Brg1 could be recruited either by ER $\alpha$  or by AP1. However, the fact that Fulvestrant does not prevent IGF-I-induced recruitment of Brg1 and the fact that ER $\alpha$  is not recruited to pS2/TFF1 promoter after 1 h of IGF-I treatment support a direct role of AP1 in this process. This suggests that transcriptional activation of the pS2/TFF1 gene via ER $\alpha$  and/or via the AP1 complex obeys different mechanisms.

Numbers of publications assume that growth factors induce a change in ER $\alpha$  phosphorylation directly via the activation of mitogen-activated protein kinase and/or AKT pathways. However, whether or not the post-translational modifications of ER $\alpha$  induce its binding to the ERE in the absence of hormone remains unclear. Our results rule out the possibility that phosphorylation of ER $\alpha$  induced by IGF-I is sufficient to directly induce ER $\alpha$  binding to the ERE in the absence of hormone. First, IGF-I does not activate transcription of a gene under the control of a promoter containing only an ERE, and secondly, we see a strong induction of the ER $\alpha$  binding to the pS2/TFF1 promoter after 1 h of estradiol treatment (data not shown) but not after 1 h of IGF-I treatment. AP1 is a target of the IGF-I signaling pathway. We observed, as previously described, an increase in the protein levels of the two subunits of AP1, c-Fos and c-Jun, after treatment with IGF-I c-Fos, increasing more rapidly than c-Jun. Activation of both AP1 subunits by phosphorylation occurred at different rates, c-Fos being very rapidly phosphorylated, whereas c-Jun phosphorylation was delayed. It has been described that estradiol induces an interaction between ER $\alpha$  and c-Jun, but not c-Fos (46). We observed that IGF-I treatment induced interaction of ER $\alpha$  with c-Jun, with a time course corresponding to c-Jun phosphorylation. Furthermore, the co immunoprecipitation studies on native protein complexes show a strong interaction between ER $\alpha$  and c-Jun upon IGF-I stimulation. IGF-I treatment also induced ER $\alpha$  interaction with c-Fos but with a time course that did not follow c-Fos phosphorylation. However, we were able to co-immunoprecipitate ER $\alpha$  and c-Fos in cross-linked protein complexes but not in native ones. This suggests that ER $\alpha$  and c-Fos belong to the same protein complex, but that their interaction is either indirect or weak. Furthermore, the extent of interaction between ER $\alpha$  and c-Jun corresponds to the level of phosphorylation of c-Jun observed over time, suggesting that this interaction may be mediated by c-Jun. Because we did not see an interaction between ER $\alpha$  and c-Jun after 1 h of treatment with IGF-I, whereas there was a clear interaction after a 3-h treatment, we analyzed ER $\alpha$  recruitment to the pS2/TFF1 promoter. Contrasting with what was seen after 1-h of treatment, after 3 h IGF-I induced recruitment of ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter, suggesting that this process is mediated by c-Jun. The delay in the recruitment of ER $\alpha$  to the pS2/TFF1 promoter (3 h) indicates that ER $\alpha$  does not play any role in the chromatin remodeling that precedes transcription initiation of this gene, but rather, in later stages of transcription. This hypothesis is reinforced by a recent report that investigated the distribution of a green fluorescent protein-ER $\alpha$  fusion transiently expressed in MCF-7 cells after treatment with estradiol or growth factors (47). Estradiol induced the formation of speckles, which are associated to a transcriptionally active form of ER $\alpha$  within 10 min. In contrast, after treatment with IGF-I, the maximum ER $\alpha$  redistribution was observed only after 90 min.

Fig. 9 presents our current working hypothesis. IGF-I induces an increase in c-Fos and c-Jun protein levels as well as their phosphorylation and the binding of AP1 to the TRE

## IGF-I-induced Activation of the pS2/TFF1 Gene



**FIGURE 9. Estrogenic activity of IGF-I; a model of ER $\alpha$ -AP1 cooperation.** *A*, upon IGF-I stimulation, c-Fos and c-Jun are phosphorylated and can dimerize to form the AP1 complex. *B*, this complex binds to the pS2/TFF1 promoter at the TRE sequence and induces chromatin remodeling by recruiting Brg1. *C*, the increase in c-Jun protein levels and phosphorylation allows the recruiting and tethering of more ER $\alpha$  via its interaction with AP1 to the pS2/TFF1 promoter at the ERE sequence. *D*, thereby, DNA-bound ER $\alpha$  can recruit coactivators and maintain a high level of transcription of the pS2/TFF1 gene.

of pS2/TFF1 promoter. When bound to DNA, the AP1 complex can recruit factors involved in chromatin remodeling, such as Brg1. Next, the increase in c-Jun protein levels and phosphorylation allows the recruiting of more ER $\alpha$  and to tether it, via its interaction with AP1, to the pS2/TFF1 promoter at the ERE sequence. Thereby, DNA-bound ER $\alpha$  can recruit coactivators and maintain a high level of transcription of the pS2/TFF1 gene.

In this study we did not investigate ER $\alpha$  phosphorylation status under IGF-I stimulation. Therefore, we cannot exclude the possibility that some IGF-I-induced ER $\alpha$  phosphorylation may contribute to the formation of the complex with c-Jun in the absence of hormone, favoring indirect recruitment of ER $\alpha$  to the promoter.

Our work provides new insights in the field of ligand-independent regulation of ER $\alpha$ . It is well known that ER $\alpha$  and the AP1 complex cooperate during transcription activation. Here we demonstrate that after IGF-I stimulation both ER $\alpha$  and the AP1 complex are required for transcription activation of the pS2/TFF1 gene but play different roles in this molecular mechanism.

*Acknowledgment*—We thank Dr Didier Trouche for a critical review of the manuscript.

### REFERENCES

- Dickson, R. B., and Lippman, M. E. (1995) *Endocr. Rev.* **16**, 559–589
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., and Chambon, P. (1995) *Science* **270**, 1491–1494
- Kumar, V., and Chambon, P. (1988) *Cell* **55**, 145–156
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Labrie, F., and Giguere, V. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1919–1927
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**,

- 122–126
- Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R. C., and Ali, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25832–25838
- Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M. G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19858–19862
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999) *Endocr. Rev.* **20**, 321–344
- Schule, R., and Evans, R. M. (1991) *Trends Genet.* **7**, 377–381
- Miner, J. N., Diamond, M. I., and Yamamoto, K. R. (1991) *Cell Growth Differ.* **2**, 525–530
- Ponta, H., Cato, A. C., and Herrlich, P. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 255–261
- Pfahl, M. (1993) *Endocr. Rev.* **14**, 651–658
- Kouzarides, T., and Ziff, E. (1988) *Nature* **336**, 646–651
- Chinenov, Y., and Kerppola, T. K. (2001) *Oncogene* **20**, 2438–2452
- Vogt, P. K. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 465–469
- Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., and Blenis, J. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 556–564
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994) *Cell* **76**, 1025–1037
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J. R. (1991) *Nature* **353**, 670–674
- Smeal, T., Binetruy, B., Mercola, D. A., Birrer, M., and Karin, M. (1991) *Nature* **354**, 494–496
- Surmacz, E., Guvakova, M. A., Nolan, M. K., Nicosia, R. F., and Sciacca, L. (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* **47**, 255–267
- Cavaillès, V., Garcia, M., and Rochefort, H. (1989) *Mol. Endocrinol.* **3**, 552–558
- Bunone, G., Briand, P. A., Miksicek, R. J., and Picard, D. (1996) *EMBO J.* **15**, 2174–2183
- Le Goff, P., Montano, M. M., Schodin, D. J., and Katzenellenbogen, B. S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4458–4466
- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J. M., and Chambon, P. (1993) *EMBO J.* **12**, 1153–1160
- Atanaskova, N., Keshamouni, V. G., Krueger, J. S., Schwartz, J. A., Miller, F., and Reddy, K. B. (2002) *Oncogene* **21**, 4000–4008
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 9817–9824
- Chalbos, D., Philips, A., Galtier, F., and Rochefort, H. (1993) *Endocrinology* **133**, 571–576
- Giamarchi, C., Solanas, M., Chailleux, C., Augereau, P., Vignon, F., Rochefort, H., and Richard-Foy, H. (1999) *Oncogene* **18**, 533–541
- Barkhem, T., Haldosen, L. A., Gustafsson, J. A., and Nilsson, S. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61**, 1273–1283
- Balaguer, P., Boussieux, A. M., Demirpence, E., and Nicolas, J. C. (2001) *Luminescence* **16**, 153–158
- Pillon, A., Boussieux, A. M., Escande, A., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M. J., Casellas, C., Nicolas, J. C., and Balaguer, P. (2005) *Environ. Health Perspect.* **113**, 278–284
- Astruc, M. E., Chabret, C., Bali, P., Gagne, D., and Pons, M. (1995) *Endocrinology* **136**, 824–832
- Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973) *Anal. Biochem.* **56**, 502–514
- Giamarchi, C., Chailleux, C., Callige, M., Rochoix, P., Trouche, D., and Richard-Foy, H. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1578**, 12–20
- McDonnell, D. P., Clemm, D. L., Hermann, T., Goldman, M. E., and Pike, J. W. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**, 659–669
- Callige, M., Kieffer, I., and Richard-Foy, H. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4349–4358
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003) *Cell* **115**, 751–763
- Alexander, M. C., Lomanto, M., Nasrin, N., and Ramaika, C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5092–5096
- William, F., Wagner, F., Karin, M., and Kraft, A. S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18166–18171
- Datta, R., Sherman, M. L., Stone, R. M., and Kufe, D. (1991) *Cell Growth Differ.* **2**, 43–49
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., and Chalbos, D. (2001) *J. Biol. Chem.*



- 276, 36361–36369
42. Philips, A., Chalbos, D., and Rochefort, H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14103–14108
43. Klotz, D. M., Hewitt, S. C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J. K., Foley, J., Maggi, A., DiAugustine, R. P., and Korach, K. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8531–8537
44. Varma, H., and Conrad, S. E. (2002) *Cancer Res.* **62**, 3985–3991
45. Jakacka, M., Ito, M., Weiss, J., Chien, P. Y., Gehm, B. D., and Jameson, J. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 13615–13621
46. Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., and Sassone-Corsi, P. (1990) *Cell* **63**, 1267–1276
47. Takahashi, T., Ohmichi, M., Kawagoe, J., Ohshima, C., Doshida, M., Ohta, T., Saitoh, M., Mori-Abe, A., Du, B., Igarashi, H., Takahashi, K., and Kurachi, H. (2005) *Endocrinology* **146**, 4082–4089



## **Partie II : Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$**

L'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  dépend du ligand auquel il est lié (agoniste, antagoniste partiel, antagoniste pur), de la présence de facteurs de croissance (EGF, IGF-I) et du type cellulaire. Pendant de nombreuses années les mécanismes mis en jeu pour moduler l'activité transcriptionnelle du RE $\alpha$  sont restés largement incompris. Les travaux de Shang (Shang and Brown, 2002) ont donné un nouvel éclairage sur l'action tissu spécifique des SERMs. Ils ont démontré que l'activité antagoniste du Tamoxifène peut être supprimée dans les cellules MCF7 (cellules cancéreuses mammaires) en augmentant artificiellement le taux du co-activateur SRC1. Inversement dans la lignée Ishikawa (cellules cancéreuses de l'endomètre) on peut supprimer l'effet agoniste du Tamoxifène en baissant artificiellement le taux de SRC1. De manière surprenante, la quantité de SRC1 n'a aucun effet dans le cas d'un autre SERM : le Raloxifène.

Ces travaux ainsi que de nombreux autres montrent que le contexte cellulaire (ligands du RE, type cellulaire, activité des voies de transduction du signal...) dans lequel se trouve le RE $\alpha$  est crucial pour la modulation de son activité transcriptionnelle. La majorité des travaux qui ont mis en évidence l'interaction du RE $\alpha$  avec d'autres protéines on utilisé des techniques assez éloignées des conditions que l'on peut retrouver dans une cellule (pulldown, double hybride). Nous avons donc souhaité identifier des partenaires du RE $\alpha$  dans des conditions les plus proches possible de la physiologie normale d'une cellule.

L'objectif de cette partie de notre travail était de purifier et caractériser les complexes protéiques associés au RE $\alpha$  dans différentes situations physiologiques ou pathologiques afin de mieux comprendre les mécanismes de la transduction du signal hormonal et son rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La difficulté majeure du projet réside dans le fait que RE $\alpha$  est une protéine cellulaire peu abondante, ce qui signifie que pour pouvoir identifier des

complexes associés au RE $\alpha$  il faut partir d'une quantité importante de cellules. Ainsi le mode de purification du RE $\alpha$  doit être très sélectif pour éviter d'être noyé par les contaminants. Nous nous sommes inspiré du système Tap-TAG développé dans le laboratoire de Bertrand Séraphin (Rigaut et al., 1999). Le principe de cette technique est de fusionner la protéine à purifier avec une double étiquette (étiquette protéine A et étiquette CBP). Ces deux étiquettes sont séparées par la séquence de clivage de la TEV, une protéase végétale dont le site de coupure n'est pas retrouvé dans les protéines animales. Toutefois nous n'avons pas choisit les étiquettes utilisées par Rigault et ses collaborateurs (étiquette protéine A et étiquette CBP : Calmodulin Binding Protein). L'étiquette protéine A permet la fixation de la protéine étiquetée à des IgG fixées de manière covalente sur des billes. Toutefois cette étiquette est volumineuse (15kD) et risque de perturber le fonctionnement du RE $\alpha$ . L'étiquette CBP interagit avec la calmoduline en présence de calcium. L'activité du RE $\alpha$  est fortement influencée par les voies de transduction du signal. Le calcium est un second messager cellulaire qui active un grand nombre de ces voies de transduction du signal. L'utilisation de ce cation dans un protocole de purification pourrait modifier la composition des complexes protéiques associés au RE $\alpha$ , nous avons donc décidé de ne pas utiliser cette étiquette. Nous avons remplacé les étiquettes protéine A et CBP par les étiquettes HA et FLAG qui permettent la purification de la protéine de fusion par immunoprécipitation avec les anticorps anti-HA et anti-FLAG. Nous avons choisi cette stratégie de purification car le RE $\alpha$  est une protéine cellulaire peu abondante, elle représente moins d'1/10 000 des protéines totales d'une cellule. Une telle purification n'est pas réalisable en une étape (en utilisant par exemple la technique de GST-pull down), car dans une telle situation le rapport signal sur bruit de fond est trop faible. Par ailleurs, voulant comparer et identifier des complexes différents dans différentes situations, il vaut mieux éviter des méthodes de purification telle que la

chromatographie échangeuse d'ions, qui risque de s'accompagner de la dissociation de sous unités lors de l'élution des protéines par l'augmentation de la force ionique.

La stratégie que nous avons choisi comporte 2 étapes de purification (fixation des complexes protéiques contenant la protéine de fusion successivement à un anticorps anti-HA couplé à des billes, puis à un anticorps anti-FLAG couplé à des billes) ce qui devrait permettre d'éliminer la grande majorité des protéines contaminantes. Contrairement aux méthodes souvent utilisées (élévation de la force ionique par exemple), les méthodes d'élution choisies sont douces (clivage entre les étiquettes HA et FLAG par la TEV puis élution par le peptide FLAG) et ne devraient pas affecter la stabilité ou la composition des complexes protéiques contenant le RE $\alpha$ . Les protéines associées au RE $\alpha$  ainsi purifiées seront identifiées par spectrométrie de masse.

Ces études essaieront de répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les partenaires recrutés par RE $\alpha$  lorsqu'il est complexé à un ligand agoniste (oestradiol), agoniste partiel (OH-Tam) ou antagoniste (ICI 182 780) ?

- Peut-on identifier des partenaires de RE $\alpha$  différents lorsque l'on bloque l'action de l'hormone à différentes étapes (blocage de la phosphorylation de RE $\alpha$ , blocage de son export nucléaire ou blocage de sa dégradation) ?

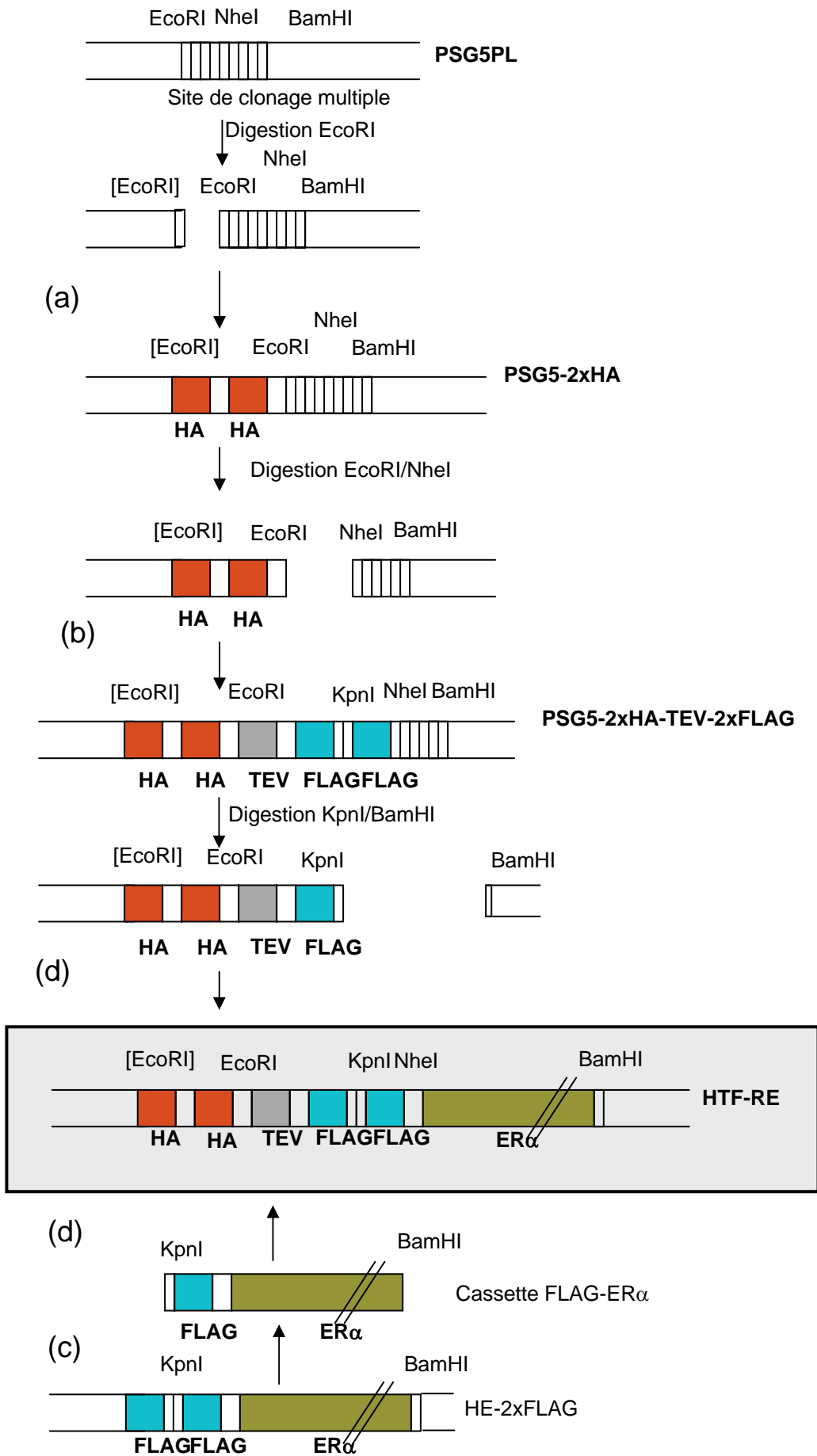
- Mieux comprendre le dialogue entre l'IGF-I et le RE $\alpha$  en purifiant les complexes protéiques associés à ce dernier lorsque l'on stimule les cellules par de l'IGF-I.

## **Résultats**

### **1/ Construction et validation du vecteur HTF-RE**

#### **a - Construction du vecteur HTF-RE**

La stratégie de construction du vecteur HTF-RE est présentée dans la figure 9. Une première séquence codant deux épitopes HA a été insérée dans le vecteur pSG5PL (plasmide

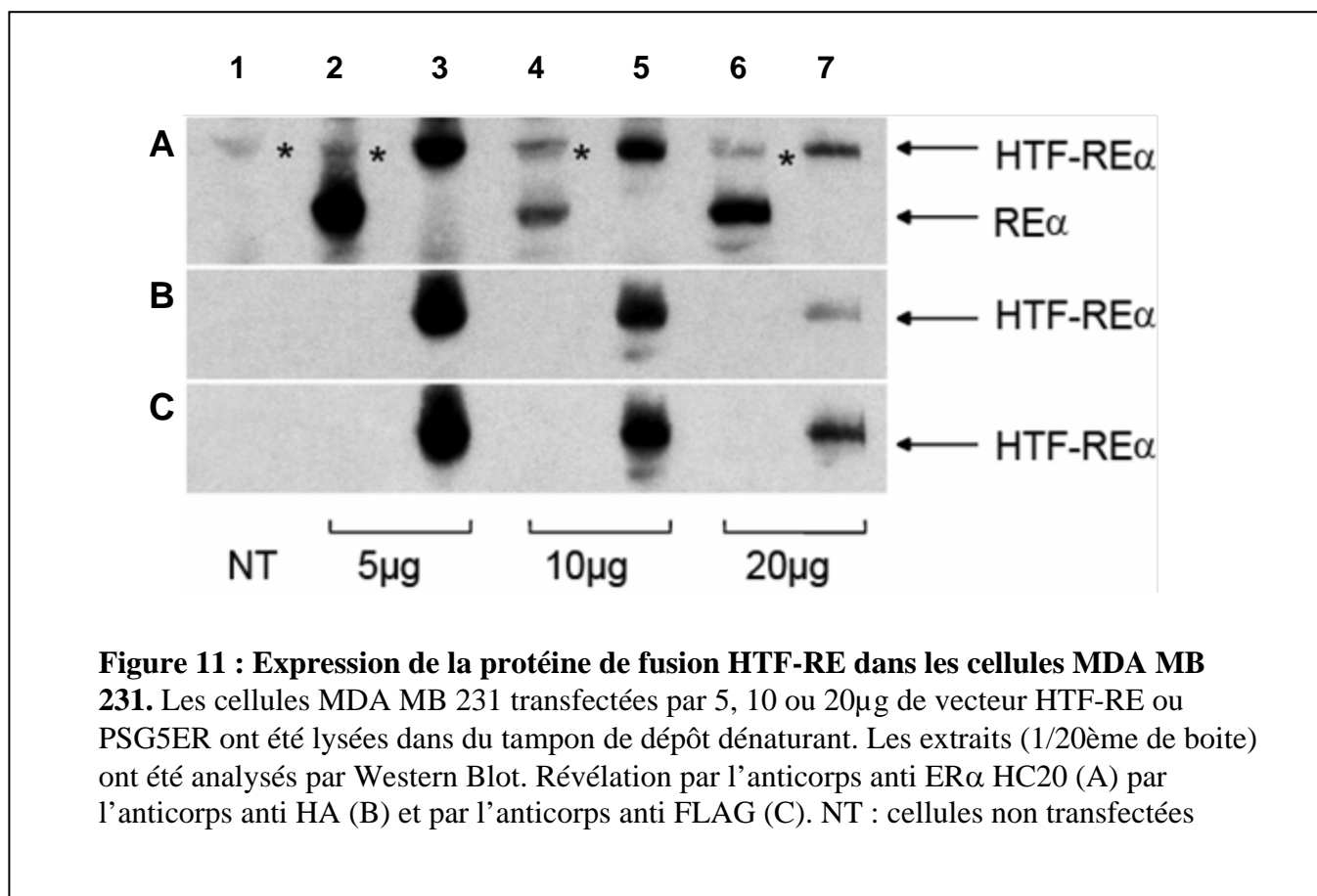
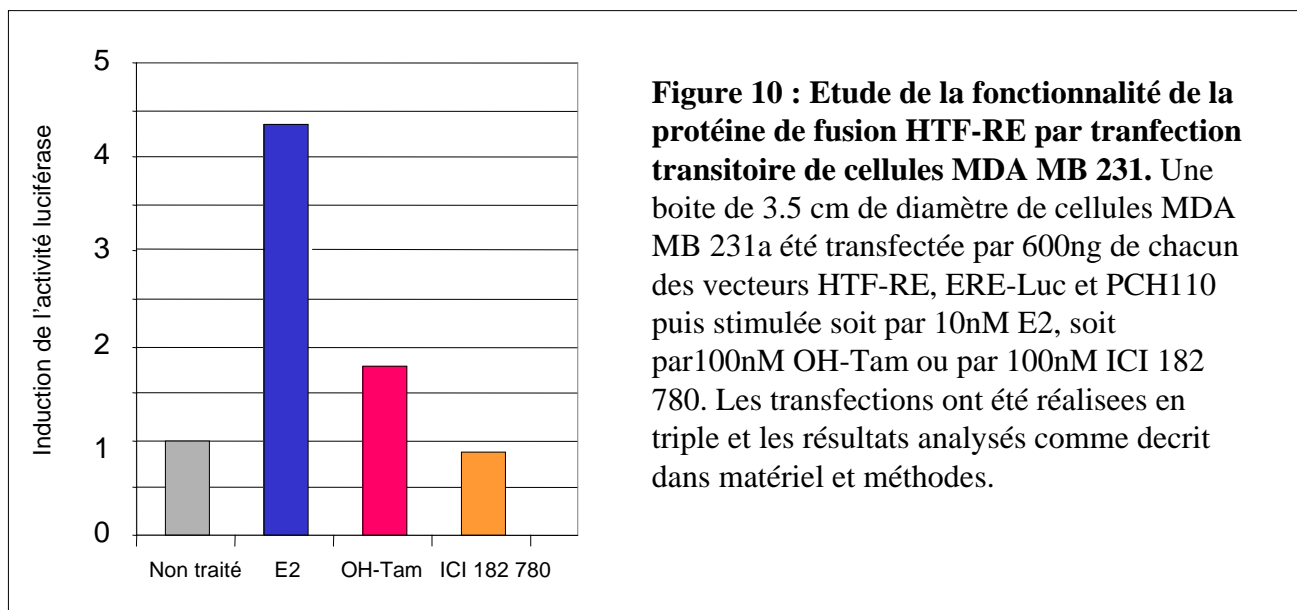


**Figure 9 : Stratégie de construction du vecteur HTF-RE.** Pour les détails voir le texte.

portant le promoteur SV40) au site EcoRI, détruisant le site EcoRI en amont de l'insert (figure9-a) générant la construction PSG52xHA. Les séquences codant le site de clivage par la TEV et deux épitopes FLAG ont été insérées dans PSG5-2xHA entre les sites EcoRI et NheI (figure9-b), générant la construction PSG5-2xHA-TEV-2XFLAG. Une cassette contenant les séquences codant le RE $\alpha$ , fusionnée à un épitopes FLAG a été excisée de la construction HE-2xFLAG (figure9-c) et insérée dans PSG5-2xHA-TEV-2XFLAG entre KpnI et BamHI (figure9-d), générant le vecteur d'expression HTF-RE. Les séquences des constructions PSG5-2xHA, PSG5-2xHA-TEV-2xFLAG et HTF-RE ont été vérifiées par séquençage.

#### **b - Test de fonctionnalité de la protéine de fusion HTF-RE**

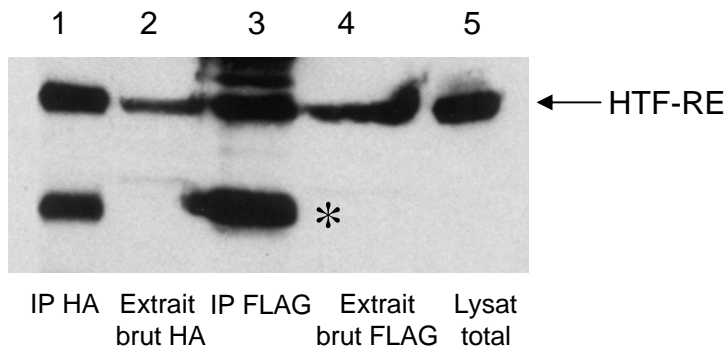
L'ajout des étiquettes (2 HA et 2 FLAG) et de la séquence de clivage de la TEV en N-terminal du récepteur  $\alpha$  aux œstrogènes peut modifier son repliement et donc son activité. Nous avons donc testé la fonctionnalité de la protéine de fusion par transfection transitoire de cellules MDA MB 231 par le vecteur HTF-RE exprimant le RE $\alpha$  étiqueté et le vecteur ERE-luc portant le gène rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur inductible par les œstrogènes. Les cellules ont ensuite été traitées par différents ligands. Les résultats présentés dans la figure 10 montrent une induction de 4.3 fois de l'activité luciférase lorsque les cellules ont été traitées par 10 nM E2. Cela indique que le récepteur étiqueté est activé par l'œstradiol et qu'il est capable de stimuler la transcription d'un gène portant sa séquence cible de fixation à l'ADN. L'induction par l'hydroxytamoxifène est plus faible (1.7 fois), ce qui est attendu puisque c'est un agoniste partiel. Lorsque les cellules ont été traitées par l'ICI 182 780, l'activité luciférase est inférieure à celle du témoin non traité. Cela est dû à l'activité d'antagoniste pur de ce composé qui bloque toute activation par de l'œstradiol résiduel ou des facteurs de croissance dans le sérum de veau foetal.



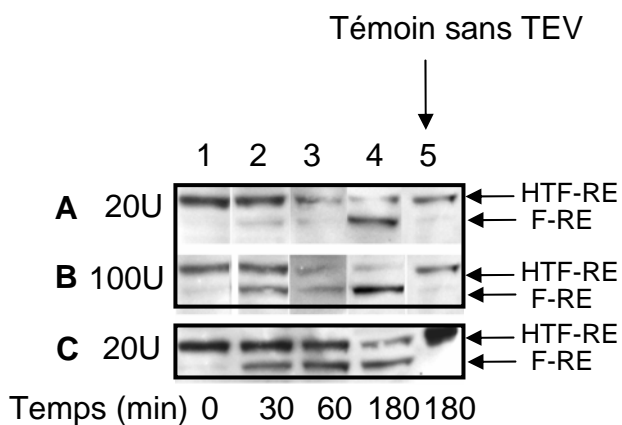
### **c - Etude des conditions d'expression de la protéine de fusion HTF-RE.**

Notre but étant d'exprimer le récepteur étiqueté en quantités importantes pour purifier des complexes protéiques, nous avons vérifié le taux d'expression de cette protéine dans des cellules MDA MB 231 transfectées transitoirement par le vecteur HTF-RE. Nous avons transfecté différentes quantités de vecteur d'expression HTF-RE ou de PSG5HEG0 ((Tora et al., 1989a), vecteur exprimant le RE $\alpha$  sauvage et servant de référence) dans ces cellules afin d'évaluer si l'obtention de quantités importantes de RE $\alpha$  étiqueté était possible dans des expériences de transfection transitoire. Dans les résultats présentés figure 11 une bande d'environ 89 kDa est visible dans les échantillons correspondant aux cellules transfectées par le vecteur HTF-RE (pistes 3, 5, 7). La bande observée a la taille attendue pour le récepteur doublement étiqueté. Les étoiles indiquent une bande non spécifique retrouvée aussi dans les cellules non transfecté et qui co-migre avec le RE $\alpha$  étiqueté. La membrane a ensuite été déshybridée pour réaliser successivement une révélation avec un anticorps anti-HA (panneau B), puis une révélation avec un anticorps anti FLAG (panneau C). Dans tout les cas on révèle la même bande, on peut donc en déduire qu'elle correspond bien au récepteur des oestrogènes doublement étiqueté. Le taux d'expression de la protéine est plus important pour les cellules qui ont été transfectées par 5 $\mu$ g de vecteur que pour les cellules qui ont été transfectées avec plus d'ADN. Cela peut s'expliquer par l'utilisation de quantités croissantes de Fugene pour réaliser la transfection, celui ci pouvant avoir un effet toxique sur les cellules, ou par la présence d'impuretés dans les préparations d'ADN. Nous pouvons donc en conclure que l'utilisation de Fugene en quantité importante pour avoir une meilleure production de HTF-RE est à proscrire.





**Figure 12 : immunoprécipitation de la protéine de fusion codée par le vecteur HTF-RE.** 2 boîtes de cellules MDA MB 231 ont été transfectées par 5µg de HTF-RE, les cellules ont été lysées dans un tampon de lyse non dénaturant, 1/33 des lysats ont été prélevés pour l'analyse de l'extrait brut et il a été réalisé une immunoprécipitation en utilisant soit un anticorps anti-HA, soit un anticorps anti FLAG. Les billes sur lesquelles sont fixés les anticorps ont été reprises dans du tampon de dépôt dénaturant, analysées par Western Blot et révélées par l'anticorps anti-HA. NT : cellules non transfectées



**Figure 13: Etude cinétique du clivage de HTF-RE par la TEV.** Une boîte de cellules MDA MB 231 a été transfectée par 5µg de vecteur HTF-RE. Les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse non dénaturant. Les extraits ont été digérés pendant différents temps par 20 (A) ou 100 unités (B) de TEV, ou par 20 unités de TEV dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) (C). Des aliquots correspondants à 1/20 des extraits totaux ont été prélevés aux différents temps. HTF-RE, protéine de fusion intacte, F-RE, protéine de fusion clivée par la TEV et ne contenant plus que l'étiquette FLAG.

#### **d - Reconnaissance des épitopes HA et FLAG en milieu non dénaturant**

La purification de sous unités de complexes protéiques associées au RE $\alpha$  devra se faire en milieu non dénaturant pour conserver les interactions entre les différents partenaires. Nous avons donc vérifié l'efficacité de reconnaissance des épitopes HA et FLAG par leur anticorps respectifs en réalisant des immunoprécipitations (voir méthodes) en milieu non dénaturant. Pour chaque expérience d'immunoprécipitation, deux boîtes de cellules MDA MB 231 transfectées par le vecteur HTF-RE ont été lysées dans un tampon hypertonique (300 Mm NaCl) permettant l'extraction de la protéine de fusion. Une immunoprécipitation anti-HA ou anti-FLAG a ensuite été réalisée sur les lysats et les protéines liées aux billes ont été analysées par Western Blot avec une révélation anti-HA. Les résultats présentés figure 12 montrent que les deux épitopes sont correctement reconnus. Les complexes associés au RE $\alpha$  pourront donc être immunoprécipités grâce à ces deux étiquettes. Dans cette expérience il faut noter la présence d'une protéine d'une masse d'environ 55 kDa. Cette bande, qui a le même profil de migration que les chaînes lourdes d'immunoglobulines, pourrait être due à une contamination par les anticorps utilisés qui ont aussi été révélés par l'anticorps secondaire.

#### **e - Etude cinétique du clivage de la protéine de fusion HTF-RE par la TEV**

Dans la protéine de fusion que nous avons construite le site de clivage par la TEV est localisé entre les deux couples d'épitopes. Il est possible que le repliement de cette région limite l'accessibilité à la TEV. Nous avons donc réalisé des expériences de clivage du RE $\alpha$  étiqueté par la TEV afin de vérifier si le site de clivage est accessible et de déterminer les temps de traitement et les quantités de protéase à ajouter pour avoir une digestion totale de la protéine étiquetée. Trois études cinétiques ont été réalisées : en présence de 20 ou 100 unités de TEV et en présence de 20 unités de TEV dans un tampon contenant des inhibiteurs de

protéases. Les résultats présentés figure 13 montrent qu'une bande d'environ 70 kDa apparaît au cours de la digestion par la TEV indiquant que le récepteur étiqueté est clivé (pistes 1 à 4). Au bout de 3 heures, avec 100 unités de TEV, le récepteur étiqueté est presque entièrement dissocié de l'étiquette HA. Le contrôle sans TEV montre que sur une durée de trois heures, il n'y a pas de clivage non spécifique de la protéine de fusion (piste5). De plus, la bande intermédiaire que l'on voit apparaître correspond bien à un clivage par la TEV car cette bande n'apparaît pas dans l'expérience où la TEV n'a pas été ajoutée (piste5). L'apparition de la bande de 70kDa en présence d'inhibiteurs de protéases (panneau B) montrent que la TEV n'est que partiellement inhibée par ce cocktail d'inhibiteurs de protéases. Il peut donc être envisagé d'ajouter des inhibiteurs de protéases pendant la purification si des problèmes de protéolyse non spécifique se présentent.

## **2/ Développement et caractérisation des lignées stables**

Les résultats d'expression du HTF-RE en transfection transitoire ont montré que les quantités de protéine exprimées étaient plus faibles que celles de RE $\alpha$  dans les cellules MCF-7 (non montré). Nous avons décidé d'établir le vecteur d'expression HTF-RE de manière stable dans des cellules MDA-MB231. Nous avons choisi ce type cellulaire car il n'exprime pas le RE $\alpha$  et donc lors de la purification des complexes protéiques il n'y aura pas de compétition entre RE $\alpha$  endogène et le HTF-RE. La génération d'une telle lignée devrait nous permettre de disposer d'une source abondante de récepteur étiqueté.

### **a – Construction des lignées stables exprimant le HTF-RE**

Dans un premier temps nous avons cloné la cassette HTF-RE dans le vecteur pSG5PL-Puromycine, portant le gène de résistance à la puromycine. Nous avons ainsi obtenu le vecteur HTF-RE Puromycine. Nous avons transfecté la lignée cellulaire MDA MB 231 par

1  $\mu\text{g}$  de ce vecteur et les cellules ont été sélectionnées sur la base de leur résistance à la puromycine (0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Plusieurs dizaines de clones ont été isolés et amplifiés.

### **b – Caractérisation des lignées cellulaires exprimant HTF-RE**

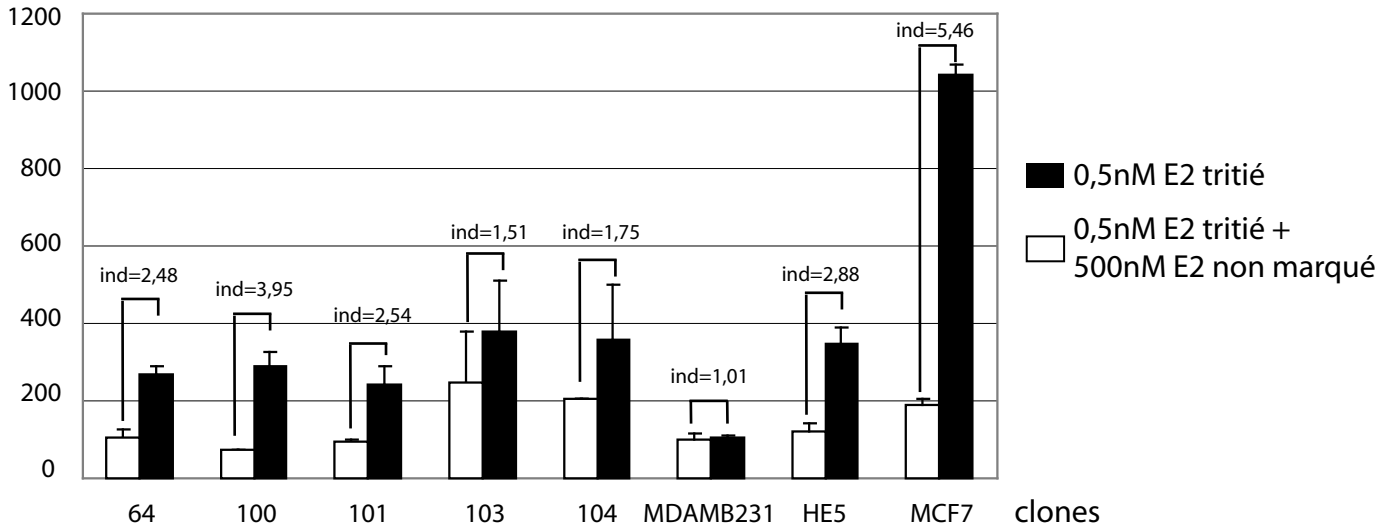
Les clones ont d'abord été criblés sur leur capacité à lier l'oestradiol (figure 14). La majorité des clones testés étaient capables de lier l'oestradiol mais avec une efficacité différente. La figure 10 montre un échantillon représentatif des clones qui ont été testés. On peut voir que l'intensité de liaison se rapproche de celle retrouvée dans la lignée HE5 (Garcia et al., 1992) plutôt que celle retrouvée dans les lignées MCF7, ce qui suggère que le taux de HTF-RE étiqueté exprimé dans ces clones cellulaires est inférieur au taux de RE $\alpha$  exprimé dans les cellules MCF7.

Nous avons ensuite évalué le taux d'expression de la protéine de fusion dans les différents clones isolés. La figure 15 montre que le clone 104 exprime plus fortement la protéine de fusion que les autres. Nous avons donc sélectionné ce clone ainsi que le clone 64, qui présente une bonne induction de la fixation d'oestradiol (figure 14) et un taux d'expression de HTF-RE assez important (figure 15), pour tester l'activité transcriptionnelle du HTF-RE.

La figure 16 montre que ces deux clones sont capables d'induire efficacement l'activité luciférase démontrant ainsi que les étiquettes du HTF-RE n'interfèrent pas avec ses fonctions d'activation de la transcription.

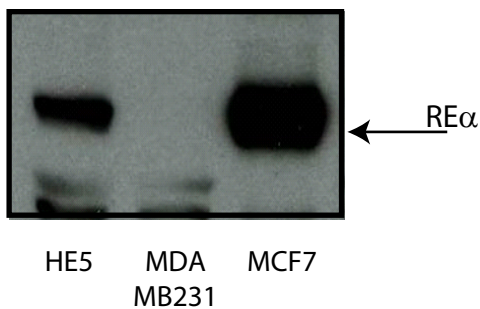
Pour finaliser la caractérisation de ces deux clones, nous avons mesuré la concentration en RE $\alpha$  intracellulaire par la méthode de Scatchard. Les graphes de la figure 17 représentent en abscisse la quantité d'oestradiol tritié lié au HTF-RE et l'axe des ordonnées représente le rapport entre la quantité d'oestradiol tritié lié au HTF-RE et la quantité d'oestradiol tritié libre (non liée au HTF-RE). Le nombre de sites liés par l'oestradiol

radioactivité (cpm)

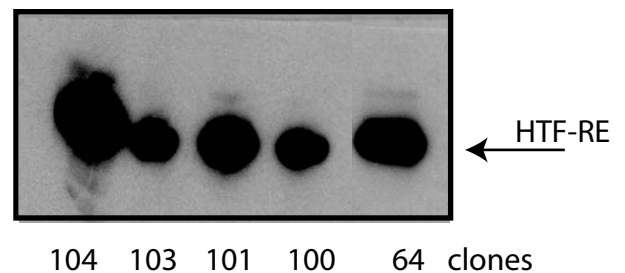


**Figure 14 : Criblage des clones sur leur capacité à lier de l'œstradiol tritié.** Le criblage a été réalisé dans des plaques de 24 puits à confluence. Les différentes lignées cellulaires ont été incubées 3 heures soit par 0,5nM d'œstradiol tritié (Amersham, référence IM135-10UCI) soit par 0,5nM d'œstradiol tritié et 500nM d'œstradiol non radioactif. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS1X et reprise dans 250µL d'éthanol 100%. Le comptage de la radioactivité est réalisé dans 4ml de scintillant (ICN référence 882470).

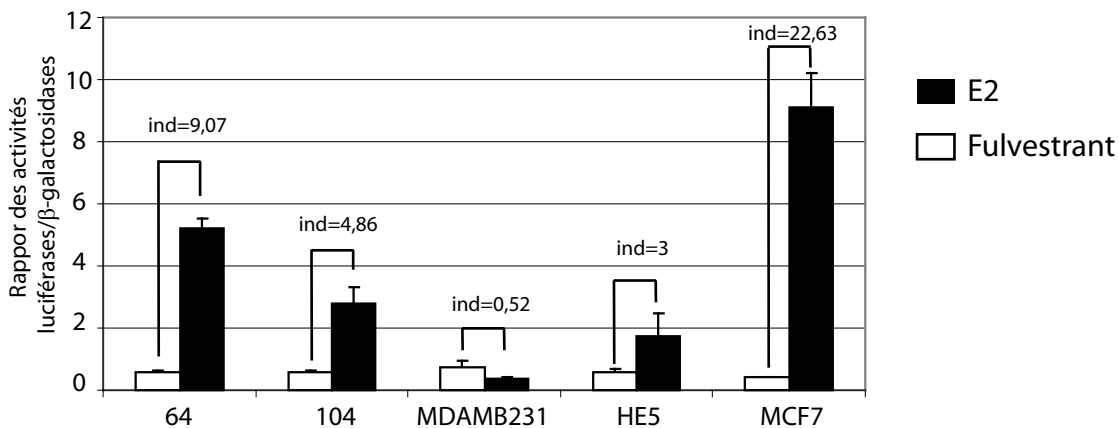
A/



B/



**Figure 15 : Expression de la protéine de fusion HTF-RE dans les différents clones dérivés des MDAMB231.** Les différents clones ont été lysés dans du tampon de dépôt dénaturant. Les extraits ont été dosés et 1µg de protéines totales ont été analysées par western blot avec l'anticorps anti REα HC20 (A) ou l'anticorps anti HA (B).



**Figure 16 : Etude de la fonctionnalité de la protéine de fusion HTF-RE dans les clones 64 et 104.** Une boîte de 3.5 cm de diamètre des différentes lignées cellulaires ont été transfectées par 600ng de chacun des vecteurs ERE-Luc et PCH110 puis stimulée soit par 10nM E2 soit par 100nM de Fulvestrant. Les transfections ont été réalisées en triple et les résultats analysés comme décrit dans matériel et méthodes.

radioactif (en nM) a été calculé en fonction de cette courbe et rapporté à la quantité de protéines (exprimées en  $\mu\text{g}$ ) dans les échantillons. En considérant que l'oestradiol lie uniquement le  $\text{RE}\alpha$  et qu'il existe un seul site de liaison à l'oestradiol sur le  $\text{RE}\alpha$ , on peut calculer la concentration en récepteur des oestrogènes étiqueté.

Nos calculs nous ont permis d'évaluer la quantité d'HTF-RE dans la lignée 64 à 20,5 fmol de récepteur par mg de protéines totales et dans la lignée 104 à 25,5 fmol de récepteur par mg de protéines totales.

Dans les cellules HE5, la concentration en  $\text{RE}\alpha$  a été calculée, elle est de 57 fmol/ $\mu\text{g}$  de protéines totales (Garcia et al., 1992). La quantité de HTF-RE dans les clones 64 et 104 est donc légèrement inférieure à celle de  $\text{RE}\alpha$  retrouvée dans la lignée HE5 ce qui est en contradiction avec nos résultats de western blot qui montrent que le taux de RE semblait être significativement plus élevé dans les clones 64 et 104 que dans la lignée HE5. Cette différence est peut être due à une protéolyse partielle du HTF- $\text{RE}\alpha$  ou à sa dénaturation au cours de l'expérience de liaison.

Après cette étape de développement des outils et leur caractérisation (développement du vecteur, des lignées stables, validation de leur fonctionnalité...). Nous sommes passés à la mise au point du protocole de purification proprement dit. Nous souhaitons mettre au point un protocole d'extraction efficace mais qui préserve en même temps l'intégrité des complexes protéiques associés au  $\text{RE}\alpha$ . Il faut en particulier éviter les changements de force ionique. Non ligandé, le  $\text{RE}\alpha$  n'est pas lié à l'ADN, il est solubilisé par une lyse hypotonique (Toft and Gorski, 1966). Complexé à l'oestradiol ou à l'hydroxy-tamoxifène le  $\text{RE}\alpha$  a une localisation nucléaire. Dans ces conditions, le récepteur peut être extrait par une lyse hypertonique (300 mM NaCl). Par ailleurs ces fortes concentrations en sels dissocient les protéines associées au  $\text{RE}\alpha$ , qui passe d'un coefficient de sédimentation 8S à 4-5S (Toft and Gorski, 1966).

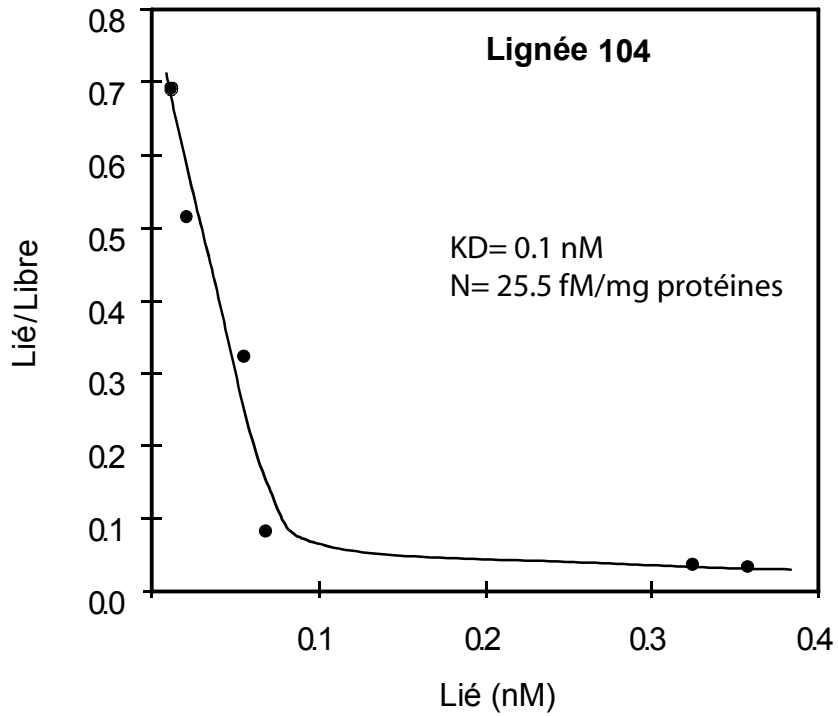
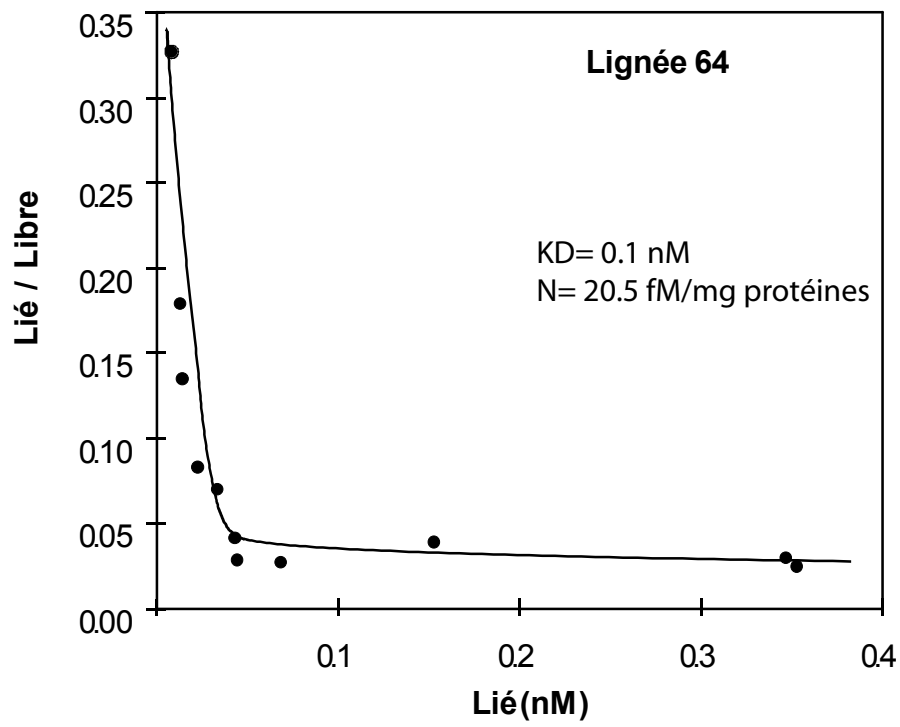


Figure 17 : Dosage du RE $\alpha$  dans les lignées 64 et 104

Nous avons testé plusieurs paramètres rentrant en jeu dans le protocole de purification.

Dans un premier temps nous avons testé l'effet du NP40 qui est un détergent non ionique peu dénaturant, utilisé classiquement pour la lyse cellulaire, sur la liaison du RE $\alpha$  avec l'oestradiol. Les détergents ont de l'affinité pour les molécules hydrophobes et ils peuvent donc titrer l'oestradiol ou d'autres ligands du RE $\alpha$ . Nous nous sommes aperçu que l'utilisation de NP40 entraînait une baisse de 50% de la liaison de l'oestradiol au RE $\alpha$  et cela probablement en déplaçant l'équilibre :



Ce déplacement de l'équilibre de liaison entre RE $\alpha$  et E2 peut entraîner un changement dans la composition des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  et donc entraîner un biais dans l'interprétation de nos résultats.

Nous avons donc décidé de ne pas utiliser de détergents et de lyser les cellules et d'extraire le récepteur étiqueté par des moyens physiques (homogénéiseur ou ultraturax) combiné à l'utilisation d'enzymes clivant l'ADN comme la nucléase de microcoque ou la DNaseI et l'ARN comme la RNaseA. Nos études préliminaires ne nous ont pas permis d'obtenir des conditions permettant une extraction satisfaisante du HTF-RE. Des mises aux points supplémentaires du protocole d'extraction restent nécessaires, en particulier en ce qui concerne la lyse de grandes quantités de cellules.

L'autre problème majeur est la quantité de cellules nécessaires pour l'identification par spectrométrie de masse des différents partenaires associés au RE $\alpha$ . La méthode de Tap-TAG est couramment utilisée dans la levure. On peut estimer grossièrement le nombre de levures nécessaire à une expérience de Tap-TAG à plusieurs dizaines de milliards de cellules. L'amplification d'une telle quantité de cellules chez les eucaryotes supérieurs est



difficilement réalisable dans un laboratoire. Il faudra envisager à l'avenir de faire produire les cellules par une société extérieure.

## DISCUSSION

### **Le dialogue entre IGF-I et RE $\alpha$**

Les mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$  lié à l'oestradiol ont été abondamment étudiés. Des études d'immunoprécipitation de chromatine ont notamment permis de montrer que le RE $\alpha$  complexé à l'oestradiol peut se lier à ses promoteurs cibles (de manière très précoce) et recruter un grand nombre de co-activateurs et de facteur qui ont des activités enzymatiques (notamment une activité histone acétyl transférase) qui permettront à leur tour le recrutement de la machinerie de base de transcription et l'activation des gènes cibles. De plus ce mode d'activation paraît être cyclique avec plusieurs vague de fixation du RE $\alpha$  (Metivier et al., 2003; Shang et al., 2000).

En revanche on sait très peu de chose sur les mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$  activé par le facteur de croissance IGF-I. Il a été montré que le facteur de croissance IGF-I a un effet 'oestrogènes' dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Vignon et al., 1987). Mais l'activation ligand indépendante du RE $\alpha$  par les facteurs de croissance n'a été découverte que de dix ans plus tard (Kato et al., 1995). Toutefois les mécanismes moléculaires fins d'action du RE $\alpha$  suite à la stimulation par les facteurs de croissance restent inconnus. Il a initialement été montré que le domaine AF1 joue un rôle important pour l'activation ligand indépendante du RE $\alpha$  (Kato et al., 1995). Bien que l'importance de ce domaine a été reconnue (notamment dans le cas de l'EGF) la situation est assez complexe. Par exemple chez la souris l'activation du RE par l'insuline dans les neuroblastes ne requiert pas la phosphorylation de la sérine 122, qui correspond à la sérine 118 chez le RE humain, tandis que la phosphorylation de cette sérine est essentielle dans les cellules COS1 (Patrone et al., 1996).

De plus le RE est activé dans les cellules endothéliales des veines du poumon par le sérum ou l'EGF mais ce processus est indépendant des MAP kinases et de la phosphorylation de la serine 118 (Karas et al., 1998). Cela démontre que les facteurs de croissance sont bien capables d'activer le RE mais que les processus de cette activation diffèrent selon les tissus.

Toutefois les travaux récents de Cascio et ses collaborateurs (Cascio et al., 2007) ont permis d'en savoir plus sur ces mécanismes moléculaires d'action. Ils ont d'abord montré, par des expériences de fractionnement cellulaire que le traitement par l'IGF-I entraîne la translocation nucléaire du RE $\alpha$ . Toutefois cette translocation est moins importante que dans le cas du traitement par l'oestradiol. Ils ont ensuite réalisés des expériences d'immunoprécipitation de chromatine sur le promoteur du gène pS2/TFF1 en traitant par de l'oestradiol ou de l'IGF-I. En ce qui concerne la fixation du RE $\alpha$  sur le promoteur de ce gène, ils obtiennent des résultats qui concordent globalement avec les nôtres : le traitement par l'IGF-I induit une faible fixation du RE $\alpha$  au bout d'une heure et cette fixation augmente avec le temps (maximum à 8 heures de traitement). Les auteurs ont ensuite étudié le recrutement des différents co-activateurs du RE $\alpha$  sur le promoteur du gène pS2/TFF1 suite au traitement par de l'oestradiol ou de l'IGF-I. Ils montrent que ce ne sont pas les mêmes co-activateurs qui sont recrutés dans les deux cas. Dans le cas d'une stimulation par l'IGF-I on retrouve le complexe SRC1/CARM sur le promoteur et la présence de ce complexe est associée à l'acétylation de l'histone H3. Tandis que dans le cas de la stimulation par l'oestradiol, on retrouve le complexe p300 / E6L (ubiquitine ligase qui dégrade p53) / CARM sur ce même promoteur et l'histone H3 n'est pas acétylée. Cela indique que les mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$  activé par ces deux voies sont différents. De plus la composition de ces complexes change selon la nature du promoteur et le temps de traitement. Toutefois ces résultats sont critiquables car les quantités de SRC1 dans les cellules MCF-7 (la lignée dont ils se sont servis pour leur étude) sont pratiquement inexistantes. On peut donc s'étonner de

retrouver ce co-activateur présent sur le promoteur du gène pS2/TFF1 après stimulation par de l'IGF-I. De plus cet article n'a pas étudié les relations entre le RE $\alpha$  et l'autre facteur de transcription qui peut se lier sur le promoteur du gène pS2/TFF1 : le complexe AP1.

Durant mes travaux de thèse je me suis plus particulièrement intéressé à cet aspect des événements moléculaires prenant place sur le promoteur pS2/TFF1 après stimulation par l'IGF - I. Nous avons démontré que, dans le cas de la stimulation par l'IGF-I, le RE $\alpha$  et le complexe AP1 sont tous les deux essentiels pour l'activation du gène pS2/TFF1. En effet la baisse artificielle d'un de ses deux facteurs de transcription par l'utilisation de siRNA dirigés contre le RE $\alpha$  ou contre c - Jun ou c - Fos (principale sous unités du complexe AP1) entraîne l'arrêt de la transcription du gène pS2/TFF1. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'importance des éléments de réponse au RE $\alpha$  et au complexe AP1 contenu dans le promoteur du gène pS2/TFF1. La stratégie que nous avons utilisée a été d'utiliser deux lignées cellulaires dérivées des cellules MCF-7 exprimant stablement la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant uniquement soit un site de fixation du RE $\alpha$  (lignée MELN) soit des sites de fixation du complexe AP1 (lignée TELN). Les résultats obtenus dans la lignée MELN montrent que le RE $\alpha$  activé par l'IGF-I est incapable d'activer la transcription d'un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur contenant seulement un ERE. Ce résultat est en contradiction avec un grand nombre d'études (Aronica and Katzenellenbogen, 1993; Ignar-Trowbridge et al., 1996; Ignar-Trowbridge et al., 1993; Kato et al., 1995; Martin et al., 2000). Tous ces travaux mettent en évidence l'activation, par l'IGF-I, de gènes rapporteurs sous le contrôle de promoteurs contenant seulement des ERE. Toutefois toutes ces études ont été réalisées en transfection transitoire alors que nous avons utilisé une lignée où le ERE luciférase est exprimé stablement. De plus nous n'avons pas utilisé le même vecteur. Pour nos études nous avons utilisé le gène rapporteur luciférase sous le contrôle du promoteur minimal de la  $\beta$ -globine, ce promoteur minimal n'a jamais été utilisé dans les autres études. Dans nos

travaux, l'absence d'induction de l'activité de la luciférase aurait pu être due à un défaut de la voie IGF-I. Pour écarter cette hypothèse nous avons vérifié que le traitement par l'IGF-I des cellules MELN entraînait l'activation de la transcription de la GAPDH, gène connu pour être induit par l'IGF-I. Le défaut d'activation du promoteur ERE  $\beta$ glob Luc par le traitement par l'IGF-I peut aussi venir de nos conditions expérimentales. En effet afin de minimiser au maximum le bruit de fond nous prétraitons les cellules 48 heures par du Fulvestrant, ce qui entraîne une déplétion quasi totale du RE $\alpha$  dans les cellules. Il aurait été possible que lors de la stimulation par l'IGF-I le niveau de RE $\alpha$  ne soit pas suffisant pour permettre l'activation transcriptionnelle. Pour écarter cette hypothèse nous avons vérifié que le gène pS2/TFF1 était bien induit ce qui démontre que les quantités de RE $\alpha$  sont suffisantes. Ainsi nous avons montré que le seul traitement par l'IGF-I est incapable d'activer la transcription d'un gène ayant un promoteur portant seulement un ERE. Cela signifie que soit le RE $\alpha$  est incapable de se lier à l'ADN, soit il est incapable de recruter des activateurs supplémentaires pour assurer l'activation de la transcription. Nous avons aussi observé que le co-traitement des cellules MELN par de l'oestradiol et de l'IGF-I conduit à une meilleure induction de la luciférase ce qui signifie que la phosphorylation du RE $\alpha$  doit faciliter le recrutement de coactivateurs de la transcription. On peut raisonnablement penser que le RE $\alpha$  activé par l'IGF-I ne peut pas lier l'ADN. Cette hypothèse est renforcée par le fait que sur le promoteur pS2/TFF1, après stimulation par l'IGF-I, le RE $\alpha$  est recruté tardivement et probablement via le complexe AP1.

L'utilisation de la lignée cellulaire TELN montre que le traitement par l'IGF-I augmente l'activité luciférase ce qui confirme que ce facteur de croissance est bien un activateur du complexe AP1. De plus, le traitement par des ligands du RE $\alpha$ , que ce soit un agoniste (oestradiol) ou un antagoniste (Fulvestrant) n'affecte pas l'activité luciférase induite par le traitement par l'IGF-I. Cela montre que sur ce type de promoteur, ou seulement le complexe AP1 peut se fixer, le RE $\alpha$  ne joue aucun rôle.

Nous avons montré que la coopération entre le RE $\alpha$  et le complexe AP1, suite au traitement par l'IGF-I, dépend de la structure du promoteur. Nous nous sommes ensuite focalisé sur ces mécanismes de coopération au niveau du promoteur pS2/TFF1 qui contient les deux éléments de réponse (au complexe AP1 et au RE).

Notre laboratoire a mis en évidence que le traitement de cellules MCF-7 par l'oestradiol ou par l'IGF-I entraînait un remodelage de la chromatine du promoteur du gène pS2/TFF1 (Giamarchi et al., 1999). Durant mes travaux de thèse j'ai démontré que ces mêmes traitements induisaient le recrutement de Brg1 (une sous unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF) sur le promoteur du gène pS2/TFF1. Dans le cas de la stimulation par l'oestradiol il est probable que ce soit le RE $\alpha$  qui recrute Brg1 car ces deux protéines sont présentes sur le promoteur du gène pS2/TFF1 au bout d'une heure de traitement ((Metivier et al., 2003) et données non publiées de ma thèse). En revanche dans le cas de la stimulation des cellules par l'IGF-I, Brg1 pourrait être recruté soit par le RE $\alpha$  soit par le complexe AP1. Le fait que le RE $\alpha$  soit absent du promoteur du gène pS2/TFF1 après 1 heure de traitement par l'IGF-I et le fait qu'un co-traitement des cellules par du Fulvestrant et de l'IGF-I n'affectent pas le recrutement de Brg1 sur le promoteur pS2/TFF1 démontrent que c'est le complexe AP1 qui est très certainement responsable du recrutement de cette sous unité du complexe de remodelage de la chromatine. Ainsi dans le cas de la stimulation par l'IGF-I c'est le complexe AP1 qui paraît jouer un rôle essentiel dans les stades précoces de la transcription du gène pS2/TFF1.

Mes travaux de thèse ont aussi eu pour but de mieux comprendre l'effet du facteur de croissance IGF-I sur l'activité du complexe AP1. Dans un premier temps, le traitement par l'IGF-I entraîne une phosphorylation rapide de c-Fos (en moins de 15 minutes) et une phosphorylation plus lente de c-Jun (apparition de c-Jun phosphorylé au bout d'une heure de

traitement par l'IGF-I). Il a été démontré précédemment que en présence d'hormone, le RE $\alpha$  interagissait avec c-Jun mais pas avec c-Fos (Teyssier et al., 2001). Nous avons observé que dans le cas de la stimulation par l'IGF-I, le RE $\alpha$  était capable d'interagir avec c-Jun en absence d'hormone. De plus les cinétiques de phosphorylation de c-Jun et d'interaction de RE $\alpha$  et c-Jun coïncident, ce qui suggère que l'interaction entre ces deux protéines est dépendante de la phosphorylation de c-Jun. En revanche nous n'avons été capable de démontrer une interaction entre RE $\alpha$  et c-Fos que dans le contexte de complexes protéiques pontés par le formaldéhyde. Sur des complexes protéiques natifs nous n'avons jamais été capable de mettre en évidence une telle interaction. Ce qui montre que RE $\alpha$  et c-Fos, après stimulation par l'IGF-I, se retrouvent au sein d'un même complexe protéique mais n'interagissent probablement pas directement ou que leur interaction n'est pas stable. De plus le RE $\alpha$  est recruté sur le promoteur du gène pS2/TFF1 et cela correspond au maximum d'interaction entre c-Jun et RE $\alpha$ , c-Jun étant présent sur le promoteur du gène pS2/TFF1, c'est probablement cette protéine qui est responsable du recrutement de RE $\alpha$  sur le promoteur du gène pS2/TFF1.

Ainsi le complexe AP1 et le RE $\alpha$  semblent avoir des fonctions distinctes dans l'activation transcriptionnelle du gène pS2/TFF1. Le complexe AP1 est requis pour les stades précoces de la transcription tandis que le RE $\alpha$  à un rôle plus tardif et semble nécessaire à un maintien efficace de la transcription dans le temps. Ce rôle tardif du RE $\alpha$  suite à la stimulation par l'IGF-I est illustré dans un autre article récent (Takahashi et al., 2005). Dans cet article, les auteurs montrent par immunofluorescence, grâce à l'utilisation d'une protéine de fusion GFP-RE $\alpha$ , que le traitement de cellules MCF-7 par de l'oestradiol entraîne la redistribution du RE $\alpha$  dans le noyau sous forme de speckles (sous forme de petits spots) en moins de dix minutes. Cette redistribution sous forme de speckles est associée à l'activation du RE $\alpha$ . En revanche lorsqu'ils traitent les cellules par de l'IGF-I, la formation de ces

speckles apparaît seulement au bout de 90 minutes de stimulation. Cela montre qu'il existe un délai important entre la stimulation par l'IGF-I et l'activation du RE $\alpha$  et donc que les mécanismes d'activation du RE $\alpha$  après traitement de cellules par de l'oestradiol ou de l'IGF-I diffèrent.

### **Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$ : perspectives**

Nous avons développé un outil permettant de purifier des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  dans différentes conditions physiologiques. L'utilisation de ce RE $\alpha$  étiqueté permettrait de répondre à certaines questions.

#### 1/ Bases moléculaires du fonctionnement des ligands du RE $\alpha$ :

De manière étonnante, des études transcriptionnelles réalisées sur des puces à ARN montrent que la stimulation de cellules cancéreuses mammaires par de l'oestradiol entraîne la baisse d'expression d'un grand nombre de gènes (Frasor et al., 2003b). La transcription de certains de ces gènes est inhibée de manière précoce (4 heures de traitement à l'oestradiol). On ne sait pas si ce mécanisme est direct ou indirect et on peut se demander si le RE $\alpha$  complexé à l'oestradiol est directement capable de réprimer la transcription de nombreux gènes. La purification des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  complexé à l'oestradiol pourrait apporter certaines réponses à ces questions. Des études similaires ont été réalisées mais cette fois ci en comparant l'expression des gènes selon que les cellules aient été traitées par l'oestradiol, le Tamoxifène ou le Raloxifène. Les auteurs mettent en évidence des différences de réponse entre les cellules traitées par le Tamoxifène ou le Raloxifène. Il existe donc certaines disparités de fonctionnement entre le RE $\alpha$  complexé au Tamoxifène ou au Raloxifène. Les auteurs ont aussi mis en évidence une soixantaine de gène spécifiquement régulés par le RE $\alpha$  complexé au Tamoxifène. Le traitement avec de l'oestradiol, du Raloxifène ou même du Fulvestrant n'affecte pas la transcription de ces gènes (Frasor et al.,



2006). Cet effet spécifique du Tamoxifène est peut être du à un partenaire particulier. La purification et la comparaison des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  complexé à ces trois ligands permettrait de mieux comprendre le fonctionnement de chacun d'eux et d'en savoir plus sur les raisons de leurs différences fonctionnelles.

Le traitement par le Fulvestrant entraîne une relocalisation du RE $\alpha$  dans un compartiment insoluble du noyau. Les partenaires du RE $\alpha$  impliqués dans cette relocalisation sont inconnus et la purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$  complexé au Fulvestrant nous permettrait d'en savoir plus sur le mode d'action de cet antagoniste pur.

## 2/Mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$ stimulé par le facteur de croissance IGF-I

Ces études de purification des complexes associés au RE $\alpha$  dans le cas d'une stimulation par de l'oestradiol ou de l'IGF-I viendraient en complément des travaux réalisés sur l'impact du traitement IGF-I sur les mécanismes moléculaires d'action du RE $\alpha$ . Le comportement du RE $\alpha$  diffère au niveau de sa stabilité de sa localisation et de ses cibles, selon qu'il soit activé par l'oestradiol ou l'IGF-I. La comparaison des complexes protéiques associés au RE $\alpha$  dans ces deux cas de stimulation permettrait de mieux comprendre les différents comportements du RE $\alpha$ .

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif des mes travaux de thèse était de mieux connaître les mécanismes moléculaires fin de fonctionnement du RE $\alpha$ . Ce facteur de transcription a un rôle assez ambigu. Il a un rôle d'oncogène en stimulant la prolifération de cellules cancéreuse mammaires RE $^+$ . Toutefois lorsque le RE est absent des cellules cancéreuses mammaires, elles ont un phénotype beaucoup plus agressif et la présence de tumeurs mammaires RE $-$  est associée à une mortalité plus importante par rapport à des tumeurs mammaires exprimant le RE $\alpha$ . Une partie de mes travaux de thèse a consisté à développer des outils pour purifier les complexes protéiques natifs associés au RE $\alpha$ , cela dans différentes situations physiologiques. L'objectif de ces travaux est d'avoir une vision plus globale du mécanisme d'activation du RE $\alpha$  en analysant toutes les protéines avec qui ce facteur de transcription peut interagir. De plus l'identification éventuelle de facteurs spécifiques du RE $\alpha$  complexé a un certain type de ligand (agoniste, SERM ou antagoniste pur) permettrait de mieux définir les bases moléculaires d'action des antagonistes RE $\alpha$ .

En particulier un des SERM les plus utilisé dans le traitement du cancer du sein est le Tamoxifène. Le traitement par cette molécule réduit le taux de mortalité de 20 à 25 % chez les patientes atteintes de cancer du sein. Toutefois chez les patients métastatiques, pour des raisons encore inexplicées, il apparaît systématiquement une résistance à cette thérapie anti-hormonale au bout d'environ 3 ans de traitement. La suractivation des voies de transduction du signal régulées par les facteurs de croissance est une cause probable de l'apparition de cette résistance au Tamoxifène. Nous avons donc aussi étudié les mécanismes d'activation du RE $\alpha$  suite à la stimulation par le facteur de croissance IGF-I. Nous avons mis en évidence l'importance cruciale d'un autre facteur de transcription : le complexe AP1. Suite au

traitement par l'IGF-I ces deux facteurs de transcription, le RE $\alpha$  et le complexe AP1, coopèrent étroitement pour assurer l'activation transcriptionnelle du gène oestrogène régulé pS2/TFF1. L'activation ligand indépendante du RE $\alpha$  semble donc requérir d'autres facteurs de transcription pour être efficace. Notamment le complexe AP1 semble jouer un rôle important et est ainsi une cible thérapeutique potentiellement intéressante dans la lutte contre le cancer du sein.

# ANNEXES

## **A- Matériel et méthodes de la partie «Purification de complexes protéiques associés au RE $\alpha$ »**

### **I Matériel biologique**

#### **1 - Lignées cellulaires**

Les cellules MDA MB 231 sont des cellules hormono-indépendantes pour leur croissance qui n'expriment pas le RE $\alpha$ . Les cellules HE5 sont des cellules MDA MB 231 dans lesquelles un vecteur exprimant constitutivement le RE $\alpha$  a été établi (Garcia et al., 1992).

#### **2 - Plasmides**

Le plasmide PSG5PL a été construit au laboratoire par insertion d'un oligonucléotide contenant des sites de clonage multiples dans le vecteur commercial PSG5 (Stratagene, vecteur qui contient le promoteur SV40). Le plasmide PSG5HEG0 (5895 pb) a été cloné dans le laboratoire du Pr. Chambon et il contient l'ADNc du RE $\alpha$  inséré le vecteur PSG5. Le plasmide ERE-Luc code la protéine luciférase sous le contrôle du promoteur minimal ERE- $\beta$ -Luc, contenant 2 EREs. Le plasmide PCH110 porte le gène rapporteur  $\beta$  gal sous le contrôle du promoteur SV40.

#### **3 - Oligonucléotides**

Oligonucléotide 2xHA sens:  
étiquette **HA1**



Les cellules ont été cultivées pendant 2 jours dans les conditions décrites ci-dessus, puis le milieu a été remplacé par un milieu ne contenant ni rouge de phénol ni antibiotiques et 5% de sérum (déstéroïdé par 3 incubations successives dans du charbon dextran). Les cellules ont ensuite été traitées pendant 2 heures par 10nM E<sub>2</sub>, ou 100nM hydroxy-tamoxifène (Sigma) ou 100nM ICI 182 780 (Tocris).

## **2 - construction des vecteurs recombinants**

*-Hybridation d'oligonucléotides complémentaires.* Les oligonucléotides simple brins complémentaires ont été mélangés (dans des quantités équimolaires) dans un tampon d'hybridation (10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl) et chauffés pendant 10 minutes à 95°C (pour dénaturer les oligonucléotides), puis les deux brins complémentaires ont été hybridés pendant 3 heures en ramenant progressivement la température de 95°C à 55°C.

*-Purification de l'ADN.* L'ADN a été purifié en utilisant le kit Genelute spin column (Sigma)

*-Clonage.* Les inserts et les vecteurs à ligaturer ont été préalablement séparés sur un gel d'agarose et purifiés. Toutes les ligatures ont été réalisées dans un rapport de 3 molécules d'insert pour 1 molécule de vecteur. La ligature a été réalisée avec 3 unités de T4 DNA ligase (Promega) dans du tampon de ligature (Promega) en incubant pendant la nuit à température ambiante.

*-Séquençage d'ADN.* Les réactions de séquences ont été réalisées avec le kit Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman) en utilisant un séquenceur automatique CEQ 2000 (Beckman) et les données analysées en utilisant le logiciel d'accompagnement.

### **3 - Transfections transitoires**

Les cellules ont étéensemencées dans des boites de diamètre 10cm (ou 3,5 cm quand c'est indiqué) avec du milieu DMEM 4.5g/l de glucose et 5% en sérum décomplémenté et déstéroïdé, de manière à ce qu'elles soient à 50-80% de confluence 24 heures plus tard. L'ADN à transférer a été incubé avec du Fugene dans un rapport ADN ( $\mu\text{g}$ )/Fugene ( $\mu\text{l}$ ) de 1/3 et le volume complété à 100 $\mu\text{l}$  avec du milieu DMEM 4.5g/l glucose, sans sérum et sans antibiotiques. Trente minutes plus tard le mélange a été ajouté au milieu de culture des cellules fraîchement remplacées par un milieu sans sérum et sans antibiotique. Six heures plus tard, le milieu de culture a été complété a 5% en sérum (décomplémenté et déstéroïdé). Quarante huit heures plus tard, le milieu de culture a été éliminé, les cellules ont été rincées 2 fois par du PBS1X puis lysées. Afin de normaliser les résultats en fonction de l'efficacité de transfection le plasmide pCH110 a été ajouté au mélange d'ADN utilisé pour la transfection en même quantité que les vecteurs exprimant les différentes formes du RE $\alpha$ .

### **4 - Mesures d'activités luciférases et $\beta$ galactosidases**

Après 2 lavages avec du PBS 1X, les cellules ont été resuspendues dans 200 $\mu\text{l}$  de tampon de lyse (Promega) et congelées pendant 30 minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour augmenter l'efficacité de la lyse. L'activité luciférase a été mesurée sur 10 $\mu\text{l}$  de lysat en ajoutant 100 $\mu\text{l}$  d'une solution « Luciferase Assay Reagent ». L'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée par incubation pendant 1 heure du lysat avec 66 $\mu\text{l}$  d'une solution « Galacto-Light »1X (Tropix). Ce mélange a été dosé par ajout de 100 $\mu\text{l}$  d'une solution « Light emission accelerator » (Tropix). Les mesures ont été réalisées dans un luminomètre de type Berthold Lumat LB 9501 avec un temps d'intégration de 10 secondes pour l'activité luciférase et de 5 secondes pour l'activité  $\beta$ -galactosidase. Les activités ont été corrigées pour l'efficacité de transfection en

utilisant les valeurs d'activité  $\beta$ -galactosidase, puis l'induction calculée par rapport aux échantillons non traités, fixés arbitrairement à 1.

## **5 - Western Blot**

Les échantillons ont été repris dans du tampon de dépôt dénaturant (50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 5% glycérol, 2mM EDTA, 1.25%  $\beta$ mercaptoethanol, 0.004% bleu de bromophénol) puis séparés par électrophorèse sur un gel SDS-page 8%, dans un tampon de migration 25mM Tris HCl pH 8.3, 200mM de glycine et 0.1% SDS. Ils ont été ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose en milieu semi-sec (192 mM glycine, 250mM Tris pH 8.3, 0.005% SDS, 20% méthanol) pendant 45 minutes à 130 mA. La membrane a été saturée pendant 10 minutes dans du PBS 1X Tween 0.1%, 10% lait puis incubée toute la nuit avec 3 $\mu$ g d'anticorps HC20 (anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le RE $\alpha$ , Santacruz) ou 10.5ng d'anticorps anti FLAG (anticorps monoclonal de souris, Sigma) ou de l'anticorps anti HA dilué 1000 fois (anticorps monoclonal de souris, Babco). La membrane a été ensuite incubée pendant 30 minutes avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la peroxydase (Santacruz) pour l'anticorps primaire HC20 et anti FAB de souris (Sigma) pour les anticorps anti-HA et anti-FLAG. La révélation a été réalisée en utilisant le kit Lumilight plus (Roche)

*Dés hybridation de la membrane.* La membrane a été incubée pendant 20 minutes dans une solution de glycine 100 mM pH 2.2, 34mM SDS, 0.1% NP40 puis lavée dans du PBS 1X Tween 0.1% et saturée pendant 10 minutes dans du PBS 1X 10% lait. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps primaire pendant la nuit et révélée comme précédemment.



## **6 - Immunoprécipitations**

L'expérience a été entièrement réalisée à 4°C. Les cellules ont été traitées pendant 20 minutes par  $10^{-8}$ M E2 puis lysées dans un tampon de lyse non dénaturant (50mM Tris pH8 contenant 0.4% de NP40, 300mM NaCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> contenant une tablette d'inhibiteur de protéase sans EDTA (Roche)). Au bout de 15 minutes, les lysats ont été centrifugés à 20800 rcf (round centrifugation force) pendant 20 minutes. Les surnageants ont été collectés et dilués pour ramener la concentration saline à 150mM NaCl et 5mM MgCl<sub>2</sub>. De la DNaseI (1µg), 2.5µM de CaCl<sub>2</sub>, 20µl de billes d'agarose couplées à des protéines A et 20 µl de billes d'agarose couplées à des protéines G ont été rajoutés (pour éliminer toutes les protéines pouvant se lier non spécifiquement aux billes). Les surnageants ont été incubés pendant 45 minutes sur une roue et centrifugés pendant 10 minutes à 420 rcf. 30µl ont été prélevés pour l'extrait brut. 2µg d'anticorps ont été ajoutés aux surnageants puis, 1 heure plus tard 20µl d'un mélange vol/vol de billes couplées à des protéines A ou G. Au bout d'1 heure, les extraits ont été centrifugés pendant 10 minutes à 420 rcf, le surnageant a été éliminé et les billes ont été lavées 3 fois dans du tampon de lavage (tampon de lyse+tampon de dilution, dans un rapport volume/volume). Les billes ont été reprises dans 20µl de tampon de lavage et 10µl de tampon de dépôt.

## **7 - Digestion par la TEV**

L'expérience a été entièrement réalisée à 4°C. Les cellules ont été lysées comme ci-dessus et diluées pour ramener la concentration saline à 150mM NaCl et 5mM MgCl<sub>2</sub>. 1mM DTT, 0.5mM EDTA puis 20 ou 100 unités de TEV ont été rajoutées au lysat (une unité de TEV clive plus de 95% de 3µg de son substrat en 1 heure à 30°C). Des aliquots correspondant à 1/20 de la fraction totale ont été prélevés à différents temps.

## 8 – Dosage du RE $\alpha$ par la méthode de Scatchard

40 millions de cellules ont été grattées dans du PBS 1X froid. Les cellules ont été centrifugées et les culots sont resuspendus dans un volume de tampon TEGWD (Tris 20mM pH 7.4, EDTA 1mM, glycérol 10%, tungstate de sodium 20mM, DTT 1mM ajouté extemporanément) et homogénéisés dans un potter verre-teflon. Les lysats ont ensuite été centrifugés pendant 45 minutes à 45000 rpm. Le surnageant (qui représente la fraction cytosoluble) a été aliquoté en fractions de 135 $\mu$ L. Les aliquots ont été incubés pendant 4 heures à 4°C avec des quantités croissantes d'oestradiol tritié (de 0,1nM à 150nM). 3 fois 10 $\mu$ L de ces extraits ont été prélevés, 5 ml de scintillant ont été ajoutés et la radioactivité a été mesurée (= mesure d'oestradiol tritié total). Le reste du lysat a été incubé avec 200 $\mu$ L d'une suspension de charbon (4% de charbon Norit, 0,4% de dextran T70, Tris 20Mm pH 7.4, EDTA 1mM) pendant 7 minutes sous agitation. Les extraits ont ensuite été centrifugés, les surnageants récupérés, repris dans 5ml de scintillant et la radioactivité a été mesurée (= mesure de la fraction d'oestradiol liée au RE $\alpha$ ). Pour les mesures de radioactivité, tous les résultats ont été corrigés pour l'effet atténuateur de l'eau et pour le rendement de l'appareil. L'oestradiol utilisé (Amersham, référence IM135-10UCI) avait une radioactivité spécifique de 95Ci/mmol d'oestradiol.

## **B- Participation à d'autres travaux de recherche**

Dans le cadre d'une collaboration entre notre équipe et le groupe d'A. Valette (UMR 5088), j'ai participé à la caractérisation de sphéroïdes de cellules mammaires en culture. Ces sphéroïdes sont un bon modèle de région avasculaire d'une tumeur. Le manuscrit est soumis pour publication.

### **Regulation of Estrogen-Induced Breast Cancer Cell Proliferation in Multicellular**

#### **Spheroids: Influence of Microenvironment**

ISABELLE TRUCHET, Ph.D., <sup>1</sup> SUZANNE JOZAN, M.D., Ph.D.,<sup>2</sup> SYLVAIN BARON, <sup>3</sup>  
PATRICK BALAGUER, Ph.D., <sup>4</sup> JEAN CLAUDE NICOLAS, Ph.D., <sup>4</sup> HELENE  
RICHARD-FOY, Ph.D. <sup>3</sup> AND ANNIE VALETTE, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LBCMCP, CNRS UMR 5088, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>2</sup>Suzanne Jozan Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Faculté de Médecine, Toulouse, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote (LBME), CNR, UMR 5099, Institut d'Exploration Fonctionnelle des Génomes (IFR 109), Université Paul Sabatier, Toulouse, France

<sup>4</sup>INSERM U824 CRCM CRLC Val d'Aurelle, Montpellier, France

## ABSTRACT

Multicellular tumor spheroids, an *in vitro* 3-D model that simulates malignant-cell contacts within a tumor, can be used to evaluate tumor response to therapeutic agents. The objective of this study was to investigate if in breast cancer cells, hormone-dependent for growth, the 3-D microenvironment could influence cell responses to estradiol. For this purpose, we used a cell line (MELN), derived from MCF-7 cells, which express the luciferase gene under the control of a synthetic estrogen-inducible promoter. We found that MELN cells grown in 3-D remain highly sensitive to estradiol in terms of growth, down-regulation of ER  $\alpha$  expression and induction of ER $\alpha$  transcriptional activity. Furthermore this 3-D model allows investigating cell response as a function of its position within the spheroid. We observed that estradiol induces an increase in survivin expression in both Ki67 positive proliferative outer layer of cells and around the necrotic zone in non-proliferating cells. In contrast, cyclin D1 induction was only observed in Ki67 positive cells, supporting a regulatory effect of cell microenvironment on the growth and survival promoting effects of estradiol. Taken together these results show that estrogen responsiveness of this 3-D spheroids is comparable to that of avascular regions of breast tumors, making this model useful for preclinical assays on therapeutic agents. This model will be useful to investigate the effects of drugs combination and to determine appropriate markers for response to treatment.

## **Introduction**

Malignant progression resulting from genetic changes of cancer cells are influenced by tumor microenvironment. Cell-cell interactions (including malignant-cell interactions) are important modulators of malignant cell phenotype. Normal breast epithelial cells form polarized acini in 3-D culture, while under the same culture conditions, breast cancer cells fail to generate acini structures. Reversal of this malignant phenotype may be observed in 3-D cultures, when using an anti- $\beta$ 1 integrin blocking antibody, but was never obtained with breast cancer cells cultured in 2-D (Wang et al., 2002; Weaver et al., 1997). Further important differences in the behavior of cells grown in 2-D and 3-D cultures have been described. For example, significant variations in serum-induced activation of ERK and PI3K signaling pathways have been demonstrated for Ewing tumor cell lines cultured as monolayers or as spheroids (Lawlor et al., 2002). Similarly, it has been demonstrated that HIF-1, a transcription factor, induced by hypoxia, does not modify the growth rate of tumor cells in 2-D whereas it supports 3-D growth under hypoxia (Leek et al., 2005).

Multicellular spheroids generated from cancer cells are a good model to investigate the influence of malignant cell-interactions (an aspect of tumor cell microenvironment) on cellular proliferation, differentiation, apoptosis and gene expression. The dynamic analysis of spheroid formation has demonstrated that integrins and cadherins are successively involved (Lin et al., 2006). Upon growth, spheroids display a gradient of proliferating cells (Sutherland, 1988). These proliferating cells are located in the outer cell-layers and the quiescent cells, are located more centrally. When the central cells become deprived in oxygen and glucose, cell death and necrosis occur. This cell heterogeneity is similar to that found in avascular microregions of tumors.

Although the hormone-dependence of ER- $\alpha$  positive breast adenocarcinoma cells spheroids growth has been described previously (Muller-Holzner et al., 1996; Olea et al.,

1994; Olea et al., 1992), little data is available regarding the effects of estradiol on individual cells within the spheroids. Estradiol bound to its receptor ER $\alpha$  is a potent mitogen in hormone-dependent breast carcinoma cells. Using standard 2-D culture, it has been shown that the stimulatory effect of estrogen on cell cycle progression in G1 is mediated by the activation of CDK4 and CDK2. The increase in activity of CDK4 results from an increased expression of its regulatory subunit cyclin D1, whereas redistribution of p21 and p27 CDK inhibitors results in the activation of the cyclin E/CDK2 complex (Planas-Silva and Weinberg, 1997; Prall et al., 1998; Prall et al., 1997). Gene profiling analysis (Frasor et al., 2003a) have shown the estrogen-induced cell cycle progression is also associated with the up-regulation of cyclin A2 and CDK1 mRNA levels. In addition, estrogens may also influence cell survival through up-regulation of the antiapoptotic gene, survivin.

In the present paper, using a multicellular tumor spheroid model, we show that breast cancer cells cultured in 3-D are highly sensitive to estradiol and that their location within the spheroid influences their response to 17- $\beta$ -estradiol, mimicking the situation in avascular regions of breast tumors.

## **Material and methods**

### Cell line and tissue culture

MELN cells are a clone derived from the breast adenocarcinoma MCF7 cells. They express the luciferase gene under the control of a synthetic estrogen-inducible promoter (Balaguer et al., 2001). Cells were grown in DMEM/F12-Glutamax+ media (GIBCO) containing 4.5 g/l glucose, 50 $\mu$ g/ml gentamycin and supplemented with 10% (v/v) of heat inactivated fetal calf serum. Culture was performed at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. To study the effect of estrogens, cells were switched to media without

phenol red and containing serum, stripped of endogenous steroids by three successive incubations with dextran-coated charcoal.

#### Spheroids generation

We have adapted the hanging-drop method (Del Duca et al., 2004) to produce MELN spheroids of similar diameter. 25µl drops containing 500 cells were suspended on the lid of agar coated 24-well dishes containing 1ml of culture media. After the 48h period time required for cell aggregation the spheroids were transferred to the culture medium.

#### Spheroid growth quantification

The size of each spheroid was determined by measuring 2 orthogonal diameters (d1 and d2) using an inverted microscope fitted with a calibrated eye piece reticule Volume was determined according to the formula:  $V=4/3\pi r^3$  where  $r=1/2 \sqrt{d1 \times d2}$ .

#### Western blot

Spheroids were rinsed with PBS and lysed in Tris 50 mM, pH 6.8, SDS 2%, glycerol 10%, β-mercapto-ethanol 5% and bromophenol blue 0.05%. Protein concentration was determined according to (Schaffner and Weissmann, 1973) and 100 µg of proteins were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane by semi-dry blotting. The membranes were hybridized with the following antibodies: mouse monoclonal antibodies, anti-p27 (pharmingen; 1/1000), anti-Survivin (Santa Cruz ;1/300), anti-actin (Chemicon International; 1/10000) and rabbit polyclonal antibodies, anti-CDK1( Oncogene; 1/250), anti-Cyclin D1 (a generous gift of V Baldin; 1/500), anti-p21 (Santa Cruz 1/1000). Actin was used as a control for equal sample loading. All quantifications were performed using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL; Amersham Life Sciences).

### Luciferase assays

MELN cells grown as monolayers or spheroids were lysed in 200 µl Promega lysis buffer and frozen. Protein content of the samples was determined using the AmidoSchwarz technique (Schaffner and Weissmann, 1973), and equal amount of proteins were used for luciferase activity measurement in all the samples. Luciferase activities were determined using the Luciferase Assay Reagent (Promega ref E397A) in a centro LB 960 (Berthold).

### Immunohistochemistry

Spheroids were rinsed with PBS and fixed in 10% neutral-buffered formalin (Sigma) for 3 hours and then paraffin embedded. Four µm thick sections were prepared (ChemMate capillary gap microscope slides, Dakocytomation, Trappes, France). The slides were deparaffinized and progressively rehydrated. Before incubation with the primary antibody they were subjected to antigen retrieval in 10mM citrate buffer (pH 6.8) for 2x5 min. Sections were incubated with the antibodies, overnight at 4°C for survivin antibody and for 1 hour at room temperature for the others primary antibodies and then rinsed. Antigens were revealed using the streptavidin-biotin LSAB2+ kit (Dakocytomation) according to the manufacturer's instructions. The primary antibodies were used as follows: mouse monoclonal anti-p21 antibody (Oncogene research products, Cambridge MA; 1/100), anti cyclinD1 (Sigma; 1/300), anti Ki-67 (Dakocytomation; 1/50), anti p27 (Pharmingen, 1/200) anti CDK1 (Cell Signaling 1/100), anti ER  $\alpha$  (a generous gift of G Delsol, 1/20) and anti survivin (Santa Cruz, 1/50).



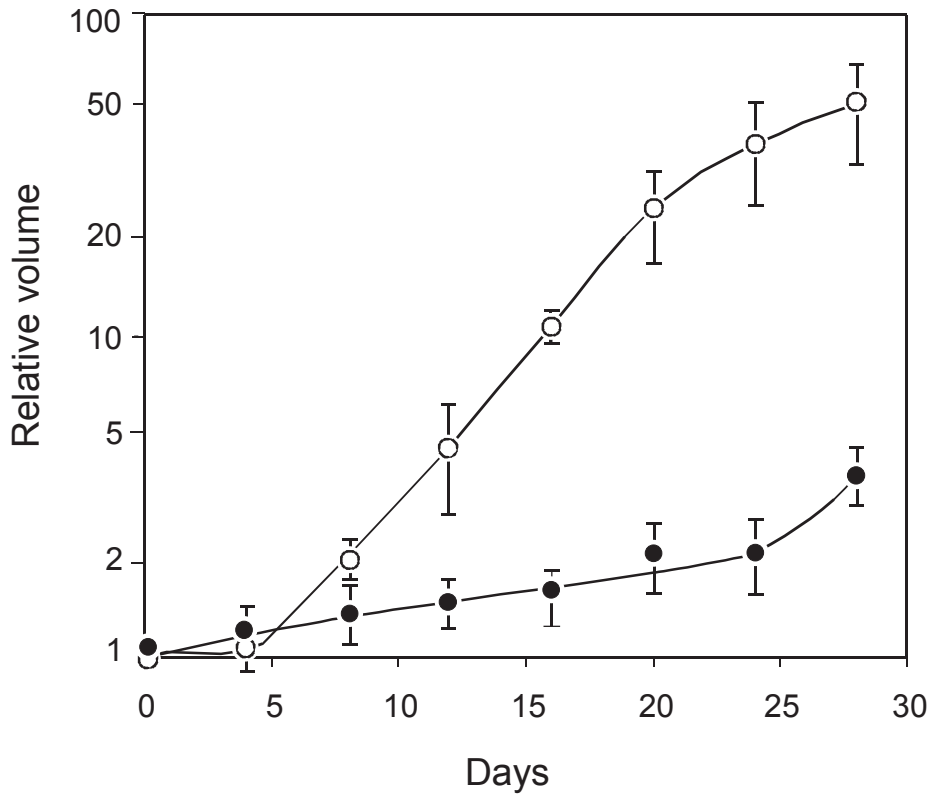


FIG. 1. Growth hormone-dependence of MELN spheroids. The MELN multicellular tumor spheroids were grown in the presence or absence of estradiol 1 nM. The volume of each spheroid was measured the day of culture initiation and at the indicated day. Spheroid diameter the day of culture initiation was around 20 $\mu$ m. Each point is the mean  $\pm$  SD of three different experiments and in each experiment the volumes of at least 4 spheroids were measured. The relative spheroid volume (ratio of the volume of the spheroids at day n, over the volume of the spheroids at day 0) is plotted as a function of time.

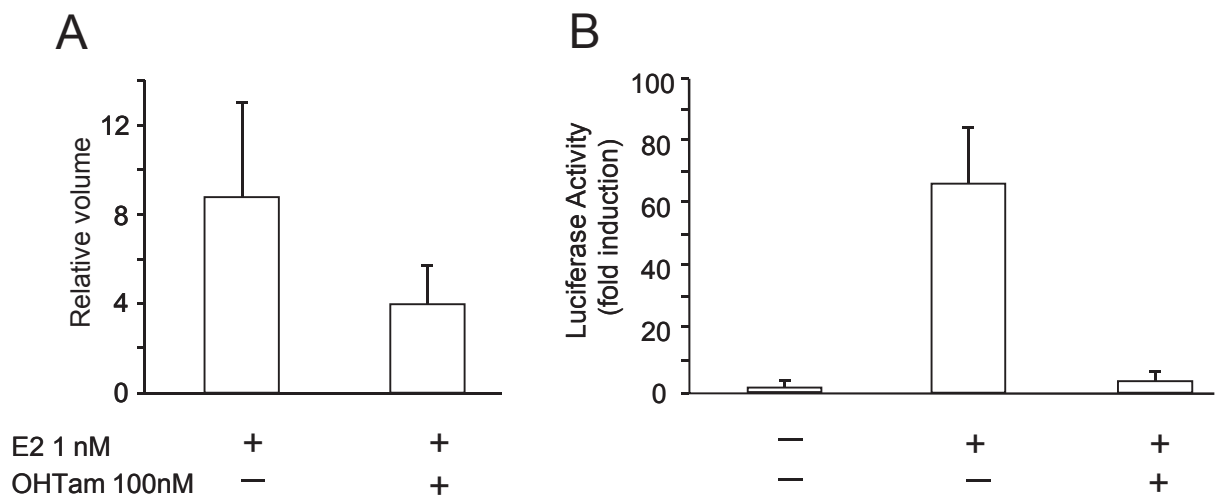


FIG. 2. Effect of OH-Tamoxifen on the responses of MELN spheroids to estradiol. A) Spheroids were grown for 15 days in the presence of 1 nM estradiol with or without 100 nM OH-Tamoxifen. The size of the spheroids was measured and results were expressed as in Figure 1. B) The estradiol-induced luciferase activity was measured in extracts prepared from MELN spheroids maintained for 15 days in the absence (control) or in presence of 1nM estradiol. OH-Tamoxifen (100nM) was added to the culture media containing estradiol for the last 24h. Results are expressed as the induction fold, relative to the untreated spheroids. In the two panels, results represent the mean  $\pm$  SD of 3 experiments. In each experiment, at least 4 spheroids were used in panel A and 10 spheroids in panel B.

## Results

### *Estradiol-dependent growth of MELN spheroids*

Growth of MELN cell spheroids was measured in presence or absence of estradiol. As shown in Figure 1 the average volume of spheroids maintained in the presence of 1 nM estradiol showed an exponential growth with respect to time between approximately days 4 and 21, whereas spheroids cultured in absence of estradiol did not grow significantly (less than 4-fold in 28 days). The addition of 100 nM of the anti-estrogen OH-Tamoxifen added at day zero caused a 50 % decrease in spheroid growth after 15 days (Figure 2A). The expression of the luciferase gene under the control of an estrogen receptor responsive element in MELN cells allowed to measure the effect of estradiol on the expression of the luciferase reporter gene integrated to the host cell genome. We observed that 1 nM 17- $\beta$ -estradiol induced a 50-fold increase in ER  $\alpha$ -dependent luciferase activity in MELN cells grown as spheroids (Figure 2B). This induction of luciferase expression was abolished in the presence of a 100-fold excess of the anti-estrogen OH-tamoxifen. This represents an estradiol-induction of gene expression 2.5 fold higher than that obtained when the cells were grown as monolayers (data not shown).

### *17- $\beta$ -estradiol-dependent regulation of cell cycle proteins expression in MELN spheroids*

To investigate the relationship between the 17- $\beta$ -estradiol-induced growth and cell cycle regulation in MELN spheroids, we first analyzed the expression pattern of proteins involved in cell cycle progression. Figure 3 presents the results obtained by Western blot. We compared the expression of the proteins, in spheroids treated or not with estradiol and grown for 15 days (panel A) and in spheroids grown in the presence of hormone for the indicated times (panel B). CDK1 was strongly induced by hormone treatment. It was detected after 10 days of treatment and continued to accumulate until day 15. This is to our knowledge the first



evidence that estrogens regulate CDK1 protein expression and it confirms results obtained at the mRNA level in gene profiling experiments (Frasor et al., 2003a). As expected, Cyclin D1 expression was also induced by estrogens and reached a steady state level after day 15. In contrast, p21 levels decreased upon hormone addition (panel A) and remained constant up to 21 days (panel B). Estradiol treatment also led to a decrease in p27 (panel A), with a p27 level that remained almost constant between 10-21 days of treatment (panel B). Besides stimulating tumor cell proliferation, estradiol increases cell survival through up-regulation of various antiapoptotic genes. Stimulation of mRNA synthesis of one of these genes, survivin, has been described in gene profiling experiments (Frasor et al., 2003a). Here we see that the protein level is also dramatically increased by estradiol, to peak at day 15.

#### *Estradiol-dependent down-regulation of ER $\alpha$ in MELN spheroids*

To further explore the regulation of hormone-dependent proliferation of breast cancer cells in 3-D culture we compared estrogen receptor levels in protein extracts of different pools of spheroids by western blot analysis. Those grown in the presence of 1 nM estradiol contained much lower levels of ER $\alpha$  than those maintained in absence of estradiol (Figure 4A). This result was further confirmed by ER $\alpha$  immunohistochemical staining (Figure 4B). Most of the cell nuclei were positive for ER $\alpha$  in spheroids maintained in the absence of estradiol, while staining intensity and number of stained nuclei were dramatically decreased in spheroids grown in the presence of 1 nM estradiol. That down-regulation of ER $\alpha$  induced by estradiol was independent of the position of cells within the spheroid.

#### *Influence of cell microenvironment on 17- $\beta$ -estradiol-dependent growth of MELN spheroids*

To further characterize the spatial regulation of MELN spheroid growth induced by estradiol, spheroids cultured for 28 days in the presence of 1 nM estradiol were

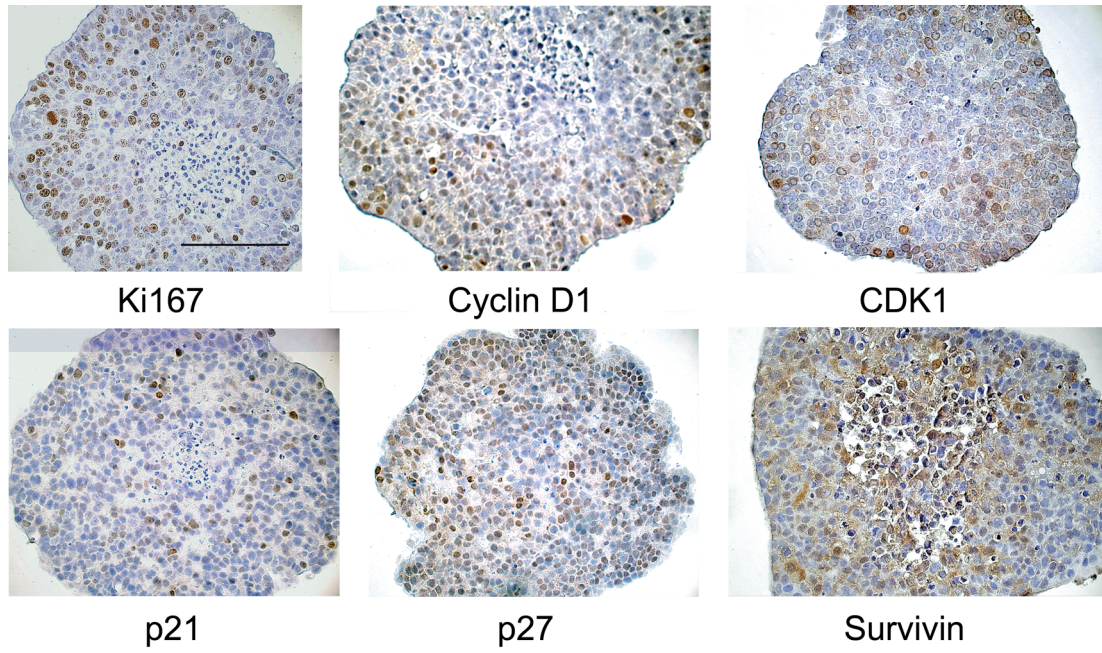


FIG. 5. Expression and distribution of Ki67, Cyclin D1, p21, p27 and survivin in MELN spheroids. Spheroids were grown in the presence of 1 nM 17- $\beta$  estradiol for 21 days. The scale bars corresponds to 100  $\mu$ m.

immunostained for the proliferation marker Ki67 (Endl and Gerdes, 2000). Figure 5 clearly shows that a high proportion of Ki67 positive cells are found on the outside of the spheroids whereas few Ki67 positive cells are found at the center of the spheroids indicating that the hormone induces a gradient of proliferation within the spheroid. We then investigated how estradiol regulates cell cycle machinery to trigger this proliferation gradient. Cyclin D1 is one of the mediators of 17- $\beta$ -estradiol mitogenic effect. We observed (Figure 5) that at the periphery of the spheroids a high proportion of the cells were positive for cyclin D1 this proportion decreases going towards the center of the spheroid. This indicates that cyclin D1 expression follows that of the proliferation marker, Ki67, We have shown (figure 3) that Cdk1 protein expression is stimulated by estradiol. Immunohistochemical staining revealed that this protein is induced by 17- $\beta$ -estradiol independently of the cell position within the spheroid (Figure 5) showing that in contrast to what was found for cyclin D1, this induction is not correlated with the proliferative capacity of MELN cells in 3-D culture. p21 expression was decreased in spheroids proliferating in presence of estradiol (Figure 3), indeed, this CDK inhibitor was only detected in a few cells. In contrast p27, another CDK inhibitor, was present in a larger proportion of cells. Both p21 and p27 positive cells were distributed throughout the spheroids in proliferating as well as in quiescent cells. Estradiol-induced survivin expression not only in proliferating cells but also in quiescent cells, survivin positive cells being observed throughout the entire spheroid, with a preference, for cells located near the necrotic zone. In addition, Figure 5 shows that in presence of hormone, Cyclin D1, p21 and p27 were essentially localized in the nucleus of MELN cells growing as spheroids, while survivin was detected in the nucleus or in the cytoplasm or both. This agrees with previous observations indicating that survivin exists in 2 subcellular pools, cytoplasmic and nuclear (Fortugno et al., 2002). The subcellular localization of survivin was not dependent on the position of positive cells within the spheroids.

## Discussion

Here we have prepared spheroids from a breast cancer cell line, MELN, using a hanging-drop method, which allows obtaining a homogenous population of spheroids. We have characterized the growth response of these MELN spheroids to hormone. We found that MELN cells in 3-D culture remained highly sensitive to estradiol in terms of growth, down-regulation of ER $\alpha$  expression and induction of ER $\alpha$  transcriptional activity. Furthermore, our results indicate that the estradiol-dependent regulation of cell proliferation within the MELN spheroid depends on the microenvironment that regulates the expression of proteins involved in cell cycle progression and survival. The 3-dimension spheroid model mimics, *in vitro*, cellular organization of avascular regions of breast tumors. This model of breast cancer tumor should allow to study hormone-dependent regulation of proliferation, and its alterations, in a context more relevant to the *in vivo* situation.

The growth of MELN spheroids is strictly dependent on the presence of estradiol in the culture medium, thus, reproducing *in vitro* what is observed *in vivo* when human hormone-dependent cancer cell lines are xenografted on nude mice. Estrogens induce cell proliferation by stimulating progression through the G1 phase of the cell cycle. This results from an increase in the expression of cyclin D1, a decrease in p27 level and a decrease in the CDK inhibitory activity associated with both p21 and p27 (Foster et al., 2001; Planas-Silva and Weinberg, 1997; Prall et al., 1997). Gene profiling experiments have shown that, in addition, estrogens up-regulate the level of CDK1 kinase (Frasor et al., 2003a), which is responsible for the G2/M transition, through its association with cyclin B. The gene coding survivin, an antiapoptotic protein (Altieri et al., 1999), is also up-regulated by estradiol (Frasor et al., 2003a). The spheroid model allows characterizing the ability of estradiol to regulate cyclin D1, p21, CDK1 and survivin proteins with respect to the cell location within the spheroid. We

found that, in the presence of estradiol, a spatial gradient of proliferation takes place within the spheroids. Cyclin D1 and Ki67 (a marker of proliferation) expression were restricted mainly to the outer cell layer, with a decrease in proportion of positive cells with increasing depth into the spheroid. This indicates that in the presence of estradiol a gradient of proliferation develops. Cells positive for CDK1 in estradiol-treated spheroids did not follow this gradient of proliferation, suggesting that, although estradiol induces CDK1 expression, the up-regulation of this kinase by itself is not associated with cell proliferation. We found that total p21 cellular content is decreased in spheroids grown in the presence of estradiol compared to those maintained in absence of estradiol (Figure 3). However, the analysis of the cellular distribution of p21 through spheroids grown in the presence of estradiol shows that p21 is expressed in proliferating cells as well as in non proliferating cells. This result is in agreement with a previous report on melanoma and mouse mammary carcinoma spheroids (LaRue et al., 2004). On another hand, in addition to its function as an inhibitor of CDK, p21 promotes the assembly of cyclin D1/CDK4 complexes (LaBaer et al., 1997) leading to cell cycle progression and is also a positive modulator of cell survival (Gorospe et al., 1999). This may explain the expression of p21 in proliferating zones within the spheroids. It has previously been shown that a strong up-regulation of p27 protein is observed when carcinoma cells are transferred from monolayer to a three-dimension culture (St. Croix et al., 1996). In agreement with the results of St Croix (St. Croix et al., 1996), we observed a high proportion of p27 positive cells in MELN spheroids, while estradiol partially down-regulated total cellular content in p27 (Figure 3). Intercellular adhesions which regulate p27 expression (Polyak et al., 1994) may allow to maintain p27 expression in a high proportion of the cells, explaining this apparent contradiction. Estradiol-induced regulation of cell survival is also mediated by its ability to up regulate the antiapoptotic protein, survivin. We show here that the estradiol-induced up-regulation of survivin depends on the position of a cell within the



spheroid. Indeed, in MELN spheroids growing in presence of estradiol survivin is induced though out the spheroid but a high proportion of positive cells are located close to the central necrotic zone. Survivin expression is controlled at the transcriptional level by both a cell cycle-dependent mechanism responsible for the increase in surviving expression in the G2/M phase of the cell cycle and an AKT-dependent pathway (Altieri, 2003). It has been shown that the testosterone-induced survivin expression in prostate cancer cells is mediated by an AKT-dependent mechanism (Zhang et al., 2005). We have also found that in MCF-7 cells estradiol stimulated survivin expression, which is mediated by the PI3K/AKT pathway (data not shown). Survivin can inhibit caspases 3, 7 and 9 and its overexpression can lead to general resistance to apoptosis. Our results suggest that the estrogen-dependent induction of survivin could play a role in the response of breast carcinoma cells to cytotoxic compounds and to hormone-therapy. We detected high levels ER  $\alpha$  in almost all cells when the spheroids were maintained in absence of estradiol. In contrast, a very important down-regulation of ER  $\alpha$  expression was observed after long-time exposure of MELN spheroids to estradiol. This was expected since regulation of ER  $\alpha$  levels by estradiol appears to be a complex process involving both transcriptional (Saceda et al., 1989) and post-transcriptional mechanisms (Nawaz et al., 1999). Our results show a hormone-induced down-regulation of ER $\alpha$  through out all the MELN spheroid, independently of the cell position. Despite this important down-regulation of ER  $\alpha$ , a strong estradiol-induced transcriptional activity was obtained. This result agrees with results of previous studies showing that ER  $\alpha$  response is fully maintained when normal or tumor mammary cells are grown in three dimensions (Novaro et al., 2003; Pourreau-Schneider et al., 1984).

Taken together, the high sensitivity to estradiol of MELN cells grown as spheroids as well as the ability of estradiol to induce a microenvironnement-dependent regulation of proteins involved in cell cycle progression and survival suggest that this 3-D model can be

very useful to study hormone-dependent breast cancer cells. We are currently using this model to investigate markers of anti-hormone response. This should allow to get new insights in the understanding the mechanisms of anti-hormone resistance. This model allows to investigate the effect of a drug and to visualize it in the different cell populations within a region of the spheroid, a model more relevant to the *in vivo* situation than 2-D cell cultures. It should be particularly useful to analyze the effects of drug-combination therapies, which are difficult to perform in details in animal models, because they are expensive and time-consuming and also raise ethical concerns regarding animal behavior.

### **Acknowledgements**

We thank Viviane Blanco for assistance in the histochemistry experiments. This work was partially supported by La Ligue Contre le Cancer du Tarn et Garonne et de Midi-Pyrénées, Association pour la Recherche contre le Cancer and Institut National du Cancer, contract #PL06\_045.

### **References**

1. Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M.J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137, 231, 1997.
2. Wang, F., Hansen, R.K., Radisky, D., Yoneda, T., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Turley, E.A., and Bissell, M.J. Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J Natl Cancer Inst* 94, 1494, 2002.
3. Lawlor, E.R., Scheel, C., Irving, J., and Sorensen, P.H. Anchorage-independent multicellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* 21, 307, 2002.

4. Leek, R.D., Stratford, I., and Harris, A.L. The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res* 65, 4147, 2005.
5. Lin, R.Z., Chou, L.F., Chien, C.C., and Chang, H.Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res* 324, 411, 2006.
6. Sutherland, R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177, 1988.
7. Muller-Holzner, E., Marth, C., Zeimet, A.G., Hofstadter, F., and Daxenbichler, G. Effects of sex- and glucocorticoid steroids on breast cancer cells grown as either multicellular tumor spheroids or monolayers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 13, 1996.
8. Olea, N., Villalobos, M., Nunez, M.I., Elvira, J., Ruiz de Almodovar, J.M., and Pedraza, V. Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models. *Cell Prolif* 27, 213, 1994.
9. Olea, N., Villalobos, M., Ruiz de Almodovar, J.M., and Pedraza, V. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *Int J Cancer* 50, 112, 1992.
10. Prall, O.W., Sarcevic, B., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 272, 10882, 1997.
11. Planas-Silva, M.D., and Weinberg, R.A. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* 17, 4059, 1997.
12. Prall, O.W., Rogan, E.M., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 18, 4499, 1998.

13. Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 144, 4562, 2003.
14. Balaguer, P., Boussioux, A.M., Demirpence, E., and Nicolas, J.C. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 16, 153, 2001.
15. Del Duca, D., Werbowetski, T., and Del Maestro, R.F. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* 67, 295, 2004.
16. Schaffner, W., and Weissmann, C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56, 502, 1973.
17. Endl, E., and Gerdes, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257, 231, 2000.
18. Fortugno, P., Wall, N.R., Giodini, A., O'Connor, D.S., Plescia, J., Padgett, K.M., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 115, 575, 2002.
19. Foster, J.S., Henley, D.C., Bukovsky, A., Seth, P., and Wimalasena, J. Multifaceted Regulation of Cell Cycle Progression by Estrogen: Regulation of Cdk Inhibitors and Cdc25A Independent of Cyclin D1-Cdk4 Function. *Mol Cell Biol* 21, 794, 2001.
20. Altieri, D.C., Marchisio, P.C., and Marchisio, C. Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [published erratum appears in *Lab Invest* 1999 Dec;79(12):1543]. *Lab Invest* 79, 1327, 1999.

21. LaRue, K.E., Khalil, M., and Freyer, J.P. Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Res* 64, 1621, 2004.
22. LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847, 1997.
23. Gorospe, M., Wang, X., and Holbrook, N.J. Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr* 7, 377, 1999.
24. St. Croix, B., Florenes, V.A., Rak, J.W., Flanagan, M., Bhattacharya, N., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2, 1204, 1996.
25. Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9, 1994.
26. Altieri, D.C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581, 2003.
27. Zhang, M., Latham, D.E., Delaney, M.A., and Chakravarti, A. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 24, 2474, 2005.
28. Saceda, M., Lippman, M.E., Lindsey, R.K., Puente, M., and Martin, M.B. Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Mol Endocrinol* 3, 1782, 1989.
29. Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1858, 1999.

30. Pourreau-Schneider, N., Berthois, Y., Mittre, H., Charpin, C., Jacquemier, J., and Martin, P.M. Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and in suspension culture: promotion of morphological heterogeneity, modulation of progestin receptor induction; cell-substrate interactions on collagen gels. *J Steroid Biochem* 21, 763, 1984.
31. Novaro, V., Roskelley, C.D., and Bissell, M.J. Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 116, 2975, 2003.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., D'Ercole, A.J., Svoboda, M.E., and Van Wyk, J.J. (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6, 400-420.
- Adlercreutz, H. (2002). Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* 3, 364-373.
- Agarwal, S.K., Guru, S.C., Heppner, C., Erdos, M.R., Collins, R.M., Park, S.Y., Saggar, S., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., *et al.* (1999). Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 96, 143-152.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R.G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem* 270, 23589-23597.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7, 261-269.
- Alexandrova, N., Niklinski, J., Bliskovsky, V., Otterson, G.A., Blake, M., Kaye, F.J., and Zajac-Kaye, M. (1995). The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 15, 5188-5195.
- Altieri, D.C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581-8589.
- Altieri, D.C., Marchisio, P.C., and Marchisio, C. (1999). Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer [published erratum appears in *Lab Invest* 1999 Dec;79(12):1543]. *Lab Invest* 79, 1327-1333.
- Alvarez, E., Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Latour, D.A., Seth, A., Abate, C., Curran, T., and Davis, R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol Chem* 266, 15277-15285.
- Amati, B., Frank, S.R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1471, M135-145.
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., and Hemmings, B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272, 31515-31524.
- Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072, 129-157.
- Anolik, J.H., Klinge, C.M., Bambara, R.A., and Hilf, R. (1993). Differential impact of flanking sequences on estradiol- vs. 4-hydroxytamoxifen-liganded estrogen receptor binding to estrogen responsive element DNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 713-730.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.
- Arcinas, M., Heckman, C.A., Mehew, J.W., and Boxer, L.M. (2001). Molecular mechanisms of transcriptional control of bcl-2 and c-myc in follicular and transformed lymphoma. *Cancer Res* 61, 5202-5206.
- Argetsinger, L.S., Hsu, G.W., Myers, M.G., Jr., Billestrup, N., White, M.F., and Carter-Su, C. (1995). Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J Biol Chem* 270, 14685-14692.

- Arnold, S.F., Melamed, M., Vorobjeikina, D.P., Notides, A.C., and Sasson, S. (1997). Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* *11*, 48-53.
- Arnold, S.F., Obourn, J.D., Jaffe, H., and Notides, A.C. (1995). Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 in vivo and by src family tyrosine kinases in vitro. *Mol Endocrinol* *9*, 24-33.
- Aronica, S.M., and Katzenellenbogen, B.S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* *7*, 743-752.
- Arteaga, C.L., Kitten, L.J., Coronado, E.B., Jacobs, S., Kull, F.C., Jr., Allred, D.C., and Osborne, C.K. (1989). Blockade of the type I somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest* *84*, 1418-1423.
- Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C., and Cleveland, J.L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* *6*, 1915-1922.
- Atanaskova, N., Keshamouni, V.G., Krueger, J.S., Schwartz, J.A., Miller, F., and Reddy, K.B. (2002). MAP kinase/estrogen receptor cross-talk enhances estrogen-mediated signaling and tumor growth but does not confer tamoxifen resistance. *Oncogene* *21*, 4000-4008.
- Augereau, P., Miralles, F., Cavailles, V., Gaudalet, C., Parker, M.G., and Rochefort, H. (1994). Characterisation of the proximal estrogen-responsive element of human cathepsin D gene. *Molecular endocrinology* *8*, 693-703.
- Bakiri, L., Matsuo, K., Wisniewska, M., Wagner, E.F., and Yaniv, M. (2002). Promoter specificity and biological activity of tethered AP-1 dimers. *Mol Cell Biol* *22*, 4952-4964.
- Balaguer, P., Boussioux, A.M., Demirpence, E., and Nicolas, J.C. (2001). Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* *16*, 153-158.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* *14*, 649-683.
- Bartucci, M., Morelli, C., Mauro, L., Ando, S., and Surmacz, E. (2001). Differential insulin-like growth factor I receptor signaling and function in estrogen receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* *61*, 6747-6754.
- Baserga, R. (1998). The IGF-IR receptor in normal and abnormal growth. In *Hormones and growth factors in development and neoplasia*, Wiley-Liss, ed. (New York), pp. 269-287.
- Beatson, G.T. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma : suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* *2*, 104-107, 162-165.
- Behrens, A., Sibilio, M., David, J.P., Mohle-Steinlein, U., Tronche, F., Schutz, G., and Wagner, E.F. (2002). Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *Embo J* *21*, 1782-1790.
- Behrens, A., Sibilio, M., and Wagner, E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* *21*, 326-329.
- Beier, F., Taylor, A.C., and LuValle, P. (1999). The Raf-1/MEK/ERK pathway regulates the expression of the p21(Cip1/Waf1) gene in chondrocytes. *J Biol Chem* *274*, 30273-30279.
- Beitner-Johnson, D., Blakesley, V.A., Shen-Orr, Z., Jimenez, M., Stannard, B., Wang, L.M., Pierce, J., and LeRoith, D. (1996). The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-I (IGF) and enhanced IGF-I signaling. *J Biol Chem* *271*, 9287-9290.



Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* *17*, 313-325.

Bentley, A., Fentiman, I.S., Rubens, R.D., Cuzick, J., Crossley, E., Durrant, K., Harris, A., Clarke, M., Collins, R., Godwin, J., *et al.* (1992). Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. *Lancet* *379*, 71.

Bergers, G., Graninger, P., Braselmann, S., Wrighton, C., and Busslinger, M. (1995). Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol* *15*, 3748-3758.

Berry, M., Nunez, A.M., and Chambon, P. (1989a). Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 1218-1222.

Berry, M., Nunez, A.M., and Chambon, P. (1989b). Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* *86*, 1218-1222.

Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., *et al.* (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* *3*, 1014-1019.

Bohen, S.P., Kralli, A., and Yamamoto, K.R. (1995). Hold'em and fold'em: chaperones and signal transduction. *Science* *268*, 1303-1304.

Bohm, M., Moellmann, G., Cheng, E., Alvarez-Franco, M., Wagner, S., Sassone-Corsi, P., and Halaban, R. (1995). Identification of p90RSK as the probable CREB-Ser133 kinase in human melanocytes. *Cell Growth Differ* *6*, 291-302.

Bompard, G., Puech, C., Prebois, C., Vignon, F., and Freiss, G. (2002). Protein-tyrosine phosphatase PTPL1/FAP-1 triggers apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* *277*, 47861-47869.

Bossy-Wetzel, E., Bravo, R., and Hanahan, D. (1992). Transcription factors junB and c-jun are selectively up-regulated and functionally implicated in fibrosarcoma development. *Genes Dev* *6*, 2340-2351.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* *18*, 5321-5333.

Brown, A.M., Jeltsch, J.M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984). Activation of pS2 gene transcription is a primary response to estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 6344-6348.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* *96*, 857-868.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997a). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* *389*, 753-758.

Brzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A., and Carlquist, M. (1997b). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* *389*, 753-758.

Bucourt, R., Richard-Foy, H., Vignau, M., Torelli, V., Geynet, C., Secco-Millet, C., Redeuilh, G., and Baulieu, E. (1978). New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor. *J Biol Chem* *253*, 8221-8228.

Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* 15, 2174-2183.

Campbell-Thompson, M., Lynch, I.J., and Bhardwaj, B. (2001). Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61, 632-640.

Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Cascio, S., Bartella, V., Garofalo, C., Russo, A., Giordano, A., and Surmacz, E. (2007). Insulin-like growth factor 1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells. *J Biol Chem* 282, 3498-3506.

Castet, A., Boulahtouf, A., Versini, G., Bonnet, S., Augereau, P., Vignon, F., Khochbin, S., Jalaguier, S., and Cavailles, V. (2004). Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res* 32, 1957-1966.

Castoria, G., Barone, M.V., Di Domenico, M., Bilancio, A., Ametrano, D., Migliaccio, A., and Auricchio, F. (1999). Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *Embo J* 18, 2500-2510.

Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M.V., and Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *Embo J* 20, 6050-6059.

Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., and Welch, W.J. (1985). The common 90-kd protein component of non-transformed '8S' steroid receptors is a heat-shock protein. *Embo J* 4, 3131-3135.

Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P., and Baulieu, E.E. (1990). Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 265, 20686-20691.

Chang, C., Norris, J.D., Gron, H., Paige, L.A., Hamilton, P.T., Kenan, D.J., Fowlkes, D., and McDonnell, D.P. (1999). Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol* 19, 8226-8239.

Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C., and Ali, S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 19, 1002-1015.

Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M., and Ali, S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7. *Mol Cell* 6, 127-137.

Chen, D., Washbrook, E., Sarwar, N., Bates, G.J., Pace, P.E., Thirunuvakkarasu, V., Taylor, J., Epstein, R.J., Fuller-Pace, F.V., Egly, J.M., *et al.* (2002). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 21, 4921-4931.

Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.

- Chen, R.H., Abate, C., and Blenis, J. (1993). Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10952-10956.
- Chen, R.H., Juo, P.C., Curran, T., and Blenis, J. (1996). Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* *12*, 1493-1502.
- Cheskis, B.J., Karathanasis, S., and Lyttle, R.C. (1997). Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *JBiolChem* *272*, 11384-11391.
- Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* *20*, 2438-2452.
- Chiu, R., Angel, P., and Karin, M. (1989). Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-Jun. *Cell* *59*, 979-986.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., and Goodman, R.H. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* *365*, 855-859.
- Chu, S., and Fuller, P.J. (1997). Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* *132*, 195-199.
- Claassen, G.F., and Hann, S.R. (1999). Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* *18*, 2925-2933.
- Clemmons, D.R. (1997). Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine Growth Factor Rev* *8*, 45-62.
- Coles, L.S., Diamond, P., Occhiodoro, F., Vadas, M.A., and Shannon, M.F. (2000). An ordered array of cold shock domain repressor elements across tumor necrosis factor-responsive elements of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter. *J Biol Chem* *275*, 14482-14493.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 3260-3265.
- Couse, J.F., Curtis Hewitt, S., and Korach, K.S. (2000). Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* *74*, 287-296.
- Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J., and Korach, K.S. (1999). Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* *286*, 2328-2331.
- Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M.G. (1997). Estrogen receptor alpha and beta form heterodimers on DNA. *JBiolChem* *272*, 19858-19862.
- Cowley, S.M., and Parker, M.G. (1999). A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* *69*, 165-175.
- Crews, C.M., Alessandrini, A., and Erikson, R.L. (1992). The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* *258*, 478-480.
- Cummings, S.R., Eckert, S., Krueger, K.A., Grady, D., Powles, T.J., Cauley, J.A., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N.H., Morrow, M., *et al.* (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *Jama* *281*, 2189-2197.
- Curtis, S.H., and Korach, K.S. (2000). Steroid receptor knockout models: phenotypes and responses illustrate interactions between receptor signaling pathways in vivo. *Adv Pharmacol* *47*, 357-380.
- D'Ercole, A.J., Stiles, A.D., and Underwood, L.E. (1984). Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 935-939.

Daksis, J.I., Lu, R.Y., Facchini, L.M., Marhin, W.W., and Penn, L.J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.

Dang, C.V. (1999). c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19, 1-11.

Darblade, B., Pendaries, C., Krust, A., Dupont, S., Fouque, M.J., Rami, J., Chambon, P., Bayard, F., and Arnal, J.F. (2002). Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha-, but not beta-, estrogen receptor. *Circ Res* 90, 413-419.

Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Davies, M.P., O'Neill, P.A., Innes, H., Sibson, D.R., Prime, W., Holcombe, C., and Foster, C.S. (2004). Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *J Mol Endocrinol* 33, 773-782.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

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

Del Duca, D., Werbowetski, T., and Del Maestro, R.F. (2004). Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* 67, 295-303.

Delage-Mourroux, R., Martini, P.G., Choi, I., Kraichely, D.M., Hoeksema, J., and Katzenellenbogen, B.S. (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, 35848-35856.

Deng, T., and Karin, M. (1993). JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 7, 479-490.

Deng, T., and Karin, M. (1994). c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 371, 171-175.

Denger, S., Reid, G., Kos, M., Flouriot, G., Parsch, D., Brand, H., Korach, K.S., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2001). ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 15, 2064-2077.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12, 3499-3511.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L., *et al.* (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-9148.

Djaborkhel, R., Tvrdik, D., Eckschlager, T., Raska, I., and Muller, J. (2000). Cyclin A down-regulation in TGFbeta1-arrested follicular lymphoma cells. *Exp Cell Res* 261, 250-259.

Dong, J., Naito, M., and Tsuruo, T. (1997). c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells. *Oncogene* 15, 639-647.

Dufourny, B., van Teeffelen, H.A., Hamelers, I.H., Sussenbach, J.S., and Steenbergh, P.H. (2000). Stabilization of cyclin D1 mRNA via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in MCF-7 human breast cancer cells. *J Endocrinol* 166, 329-338.

- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.P., Rath, M., and Wagner, E.F. (2003). Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* *112*, 181-192.
- Eferl, R., Sibilina, M., Hilberg, F., Fuchsbichler, A., Kufferath, I., Guertl, B., Zenz, R., Wagner, E.F., and Zatloukal, K. (1999). Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol* *145*, 1049-1061.
- Egly, J.M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIID: from transcription to clinic. *FEBS Lett* *498*, 124-128.
- Ellis, M. (2004). Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. *Oncologist* *9 Suppl 3*, 20-26.
- Ellis, M.J., Leav, B.A., Yang, Z., Rasmussen, A., Pearce, A., Zweibel, J.A., Lippman, M.E., and Cullen, K.J. (1996). Affinity for the insulin-like growth factor-II (IGF-II) receptor inhibits autocrine IGF-II activity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Endocrinol* *10*, 286-297.
- Endl, E., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* *257*, 231-237.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., and Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* *19*, 5363-5372.
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M., and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* *82*, 4258-4265.
- Espinosa, L., Ingles-Esteve, J., Robert-Moreno, A., and Bigas, A. (2003). IkappaBalpha and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NFkappaB pathways. *Mol Biol Cell* *14*, 491-502.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* *69*, 119-128.
- Facchini, L.M., and Penn, L.Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *Faseb J* *12*, 633-651.
- Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., and West, B.L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* *280*, 1747-1749.
- Fialka, I., Schwarz, H., Reichmann, E., Oft, M., Busslinger, M., and Beug, H. (1996). The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* *132*, 1115-1132.
- Fixemer, T., Remberger, K., and Bonkhoff, H. (2003). Differential expression of the estrogen receptor beta (ERbeta) in human prostate tissue, premalignant changes, and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *Prostate* *54*, 79-87.
- Fleischmann, A., Jochum, W., Eferl, R., Witowsky, J., and Wagner, E.F. (2003). Rhabdomyosarcoma development in mice lacking Trp53 and Fos: tumor suppression by the Fos protooncogene. *Cancer Cell* *4*, 477-482.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and 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 J* *19*, 4688-4700.
- Foletta, V.C., Sonobe, M.H., Suzuki, T., Endo, T., Iba, H., and Cohen, D.R. (1994). Cloning and characterisation of the mouse fra-2 gene. *Oncogene* *9*, 3305-3311.
- Font de Mora, J., and Brown, M. (2000). AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* *20*, 5041-5047.

Fortugno, P., Wall, N.R., Giodini, A., O'Connor, D.S., Plescia, J., Padgett, K.M., Tognin, S., Marchisio, P.C., and Altieri, D.C. (2002). Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* *115*, 575-585.

Foster, J.S., Henley, D.C., Bukovsky, A., Seth, P., and Wimalasena, J. (2001). Multifaceted Regulation of Cell Cycle Progression by Estrogen: Regulation of Cdk Inhibitors and Cdc25A Independent of Cyclin D1-Cdk4 Function. *Mol Cell Biol* *21*, 794-810.

Frampton, J., Ramqvist, T., and Graf, T. (1996). v-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells. *Genes Dev* *10*, 2720-2731.

Frasor, J., Chang, E.C., Komm, B., Lin, C.-Y., Vega, V.B., Liu, E.T., Miller, L.D., Smeds, J., Bergh, J., and Katzenellenbogen, B.S. (2006). Gene Expression Preferentially Regulated by Tamoxifen in Breast Cancer Cells and Correlations with Clinical Outcome. *Cancer Res* *66*, 7334-7340.

Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S. (2003a). Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* *144*, 4562-4574.

Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C.N., Lyttle, C.R., and Katzenellenbogen, B.S. (2003b). Profiling of Estrogen Up- and Down-Regulated Gene Expression in Human Breast Cancer Cells: Insights into Gene Networks and Pathways Underlying Estrogenic Control of Proliferation and Cell Phenotype. *Endocrinology* *144*, 4562-4574.

Freedman, M., San Martin, J., O'Gorman, J., Eckert, S., Lippman, M.E., Lo, S.C., Walls, E.L., and Zeng, J. (2001). Digitized mammography: a clinical trial of postmenopausal women randomly assigned to receive raloxifene, estrogen, or placebo. *J Natl Cancer Inst* *93*, 51-56.

Garcia, M., Derocq, D., Freiss, G., and Rochefort, H. (1992). Activation of estrogen receptor transfected into a receptor-negative breast cancer cell line decreases the metastatic and invasive potential of the cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 11538-11542.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4510-4515.

Gaub, M.P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., and Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell* *63*, 1267-1276.

Ghoda, L., Lin, X., and Greene, W.C. (1997). The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I $\kappa$ B and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem* *272*, 21281-21288.

Ghosh, S., May, M.J., and Kopp, E.B. (1998). NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* *16*, 225-260.

Giamarchi, C., Solanas, M., Chailleux, C., Augereau, P., Vignon, F., Rochefort, H., and Richard-Foy, H. (1999). Chromatin structure of the regulatory regions of pS2 and cathepsin D genes in hormone-dependent and -independent breast cancer cell lines. *Oncogene* *18*, 533-541.

Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M.H., and Shaw, P.E. (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *Embo J* *14*, 951-962.

Gille, H., Sharrocks, A.D., and Shaw, P.E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* *358*, 414-417.

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

Giorgetti, S., Pelicci, P.G., Pelicci, G., and Van Obberghen, E. (1994). Involvement of Src-homology/collagen (SHC) proteins in signaling through the insulin receptor and the insulin-like-growth-factor-I-receptor. *Eur J Biochem* 223, 195-202.

Glover, J.N., and Harrison, S.C. (1995). Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373, 257-261.

Gorospe, M., Wang, X., and Holbrook, N.J. (1999). Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr* 7, 377-385.

Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J.D., Hbaidu, A., Goode, R.G., Sandusky, G.E., *et al.* (2000). Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem* 275, 24500-24505.

Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., and Shine, J. (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154.

Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 2423-2435.

Grigoriadis, A.E., Schellander, K., Wang, Z.Q., and Wagner, E.F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *J Cell Biol* 122, 685-701.

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

Gronemeyer, H., and Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1173-1308.

Gruda, M.C., Kovary, K., Metz, R., and Bravo, R. (1994). Regulation of Fra-1 and Fra-2 phosphorylation differs during the cell cycle of fibroblasts and phosphorylation in vitro by MAP kinase affects DNA binding activity. *Oncogene* 9, 2537-2547.

Gupta, S., Campbell, D., Derijard, B., and Davis, R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389-393.

Habib, T., Herrera, R., and Decker, S.J. (1994). Activators of protein kinase C stimulate association of Shc and the PEST tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 269, 25243-25246.

Hadsell, D.L., Greenberg, N.M., Fligger, J.M., Baumrucker, C.R., and Rosen, J.M. (1996). Targeted expression of des(1-3) human insulin-like growth factor I in transgenic mice influences mammary gland development and IGF-binding protein expression. *Endocrinology* 137, 321-330.

Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.

Hall, J.M., and McDonnell, D.P. (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.

Han, V.K., D'Ercole, A.J., and Lund, P.K. (1987). Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 236, 193-197.

Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F.E., and Pollak, M. (1998). Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 351, 1393-1396.

Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, M.C., and Brown, M. (1999). Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* 13, 129-137.

Haus-Seuffert, P., and Meisterernst, M. (2000). Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. *Mol Cell Biochem* 212, 5-9.

He, W., Craparo, A., Zhu, Y., O'Neill, T.J., Wang, L.M., Pierce, J.H., and Gustafson, T.A. (1996). Interaction of insulin receptor substrate-2 (IRS-2) with the insulin and insulin-like

growth factor I receptors. Evidence for two distinct phosphotyrosine-dependent interaction domains within IRS-2. *J Biol Chem* 271, 11641-11645.

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

Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 715-725.

Henriksson, M., Bakardjiev, A., Klein, G., and Luscher, B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* 8, 3199-3209.

Henttu, P.M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.

Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J.F., Obaya, A.J., O'Connell, B.C., Mateyak, M.K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.

Herrlich, P. (2001). Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* 20, 2465-2475.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-2148.

Hill, C.S., Marais, R., John, S., Wynne, J., Dalton, S., and Treisman, R. (1993). Functional analysis of a growth factor-responsive transcription factor complex. *Cell* 73, 395-406.

Hill, C.S., Wynne, J., and Treisman, R. (1994). Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *Embo J* 13, 5421-5432.

Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Goto, W., Orimo, A., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y., and Muramatsu, M. (1999). Differential immunolocalization of estrogen receptor alpha and beta in rat ovary and uterus. *J Mol Endocrinol* 22, 37-44.

Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J., and Stallcup, M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* 17, 2735-2744.

Hong, S.H., and Privalsky, M.L. (2000). The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 6612-6625.

Howard, B.A., and Gusterson, B.A. (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 119-137.

Hu, E., Mueller, E., Oliviero, S., Papaioannou, V.E., Johnson, R., and Spiegelman, B.M. (1994). Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *Embo J* 13, 3094-3103.

Huang, H.J., Norris, J.D., and McDonnell, D.P. (2002). Identification of a negative regulatory surface within estrogen receptor alpha provides evidence in support of a role for corepressors in regulating cellular responses to agonists and antagonists. *Mol Endocrinol* 16, 1778-1792.

Huang, Z.M., and Yen, T.S. (1995). Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol* 15, 3864-3869.

Huynh, H., Nickerson, T., Pollak, M., and Yang, X. (1996). Regulation of insulin-like growth factor I receptor expression by the pure antiestrogen ICI 182780. *Clin Cancer Res* 2, 2037-2042.

Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R.G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20, 761-787.



Ignar-Trowbridge, D.M., Pimentel, M., Parker, M.G., McLachlan, J.A., and Korach, K.S. (1996). Peptide growth factor cross-talk with the estrogen receptor requires the A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology* *137*, 1735-1744.

Ignar-Trowbridge, D.M., Teng, C.T., Ross, K.A., Parker, M.G., Korach, K.S., and McLachlan, J.A. (1993). Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol Endocrinol* *7*, 992-998.

Impey, S., Obrietan, K., Wong, S.T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J.C., Chan, G., and Storm, D.R. (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* *21*, 869-883.

Iordanov, M., Bender, K., Ade, T., Schmid, W., Sachsenmaier, C., Engel, K., Gaestel, M., Rahmsdorf, H.J., and Herrlich, P. (1997). CREB is activated by UVC through a p38/HOG-1-dependent protein kinase. *Embo J* *16*, 1009-1022.

Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13180-13185.

Israel, A. (2000). The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* *10*, 129-133.

Ivanov, V.N., Bhoumik, A., Krasilnikov, M., Raz, R., Owen-Schaub, L.B., Levy, D., Horvath, C.M., and Ronai, Z. (2001). Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* *7*, 517-528.

Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (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.

Janicke, R.U., Lee, F.H., and Porter, A.G. (1994). Nuclear c-Myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Mol Cell Biol* *14*, 5661-5670.

Jarvinen, T.A., Pelto-Huikko, M., Holli, K., and Isola, J. (2000). Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* *156*, 29-35.

Jensen, E.V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* *6*, 47-59.

Jensen, E.V. (1966). Mechanism of estrogen action in relation to carcinogenesis. *Proc Can Cancer Conf* *6*, 143-165.

Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S., and DeSombre, E.R. (1969). Estrogen-binding substances of target tissues. *Steroids* *13*, 417-427.

Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T.M., Gleiberman, A.S., Lunyak, V., McEvelly, R.J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., *et al.* (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* *102*, 753-763.

Jochum, W., Passegue, E., and Wagner, E.F. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* *20*, 2401-2412.

Joel, P.B., Smith, J., Sturgill, T.W., Fisher, T.L., Blenis, J., and Lannigan, D.A. (1998). pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* *18*, 1978-1984.

Joel, P.B., Traish, A.M., and Lannigan, D.A. (1995). Estradiol and phorbol ester cause phosphorylation of serine 118 in the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* *9*, 1041-1052.

Jordan, V.C. (1984). Biochemical pharmacology of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* *36*, 245-276.

Jost, J.P., Seldran, M., and Geiser, M. (1984). Preferential binding of estrogen-receptor complex to a region containing the estrogen-dependent hypomethylation site preceding the chicken vitellogenin II gene. *Proc Natl Acad Sci USA* *81*, 429-433.

Julie A. Frearson, D.R.A. (1997). The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction. *BioEssays* 19, 417-427.

Kaaks, R., Lundin, E., Rinaldi, S., Manjer, J., Biessy, C., Soderberg, S., Lenner, P., Janzon, L., Riboli, E., Berglund, G., *et al.* (2002). Prospective study of IGF-I, IGF-binding proteins, and breast cancer risk, in northern and southern Sweden. *Cancer Causes Control* 13, 307-316.

Kahlert, S., Nuedling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R., and Grohe, C. (2000). Estrogen receptor alpha rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem* 275, 18447-18453.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., *et al.* (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Karas, R.H., Gauer, E.A., Bieber, H.E., Baur, W.E., and Mendelsohn, M.E. (1998). Growth factor activation of the estrogen receptor in vascular cells occurs via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Clin Invest* 101, 2851-2861.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270, 16483-16486.

Karin, M. (1999). How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867-6874.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Krauter, P., Westphal, H.M., and Beato, M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature* 308, 513-519.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491-1494.

Kato, Y., Kravchenko, V.V., Tapping, R.I., Han, J., Ulevitch, R.J., and Lee, J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* 16, 7054-7066.

Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., and Cobb, M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.

Kim, J.H., Li, H., and Stallcup, M.R. (2003). CoCoA, a nuclear receptor coactivator which acts through an N-terminal activation domain of p160 coactivators. *Mol Cell* 12, 1537-1549.

Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T., Homenko, D.R., and Kraus, W.L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20, 1479-1493.

Kinsinger, L.S., Harris, R., Woolf, S.H., Sox, H.C., and Lohr, K.N. (2002). Chemoprevention of breast cancer: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 137, 59-69.

Kleefstrom, J., Vastrik, I., Saksela, E., Valle, J., Eilers, M., and Alitalo, K. (1994). c-Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF-alpha. *Embo J* 13, 5442-5450.

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

Knutti, D., Kressler, D., and Kralli, A. (2001). Regulation of the transcriptional coactivator PGC-1 via MAPK-sensitive interaction with a repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9713-9718.

Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15, 2057-2063.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15677-15682.

Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* *138*, 863-870.

Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5925-5930.

Kumar, V., and Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* *55*, 145-156.

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

Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. (1986). Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *Embo J* *5*, 2231-2236.

Kuntz, M.A., and Shapiro, D.J. (1997). Dimerizing the estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* *272*, 27949-27956.

Kustikova, O., Kramerov, D., Grigorian, M., Berezin, V., Bock, E., Lukanidin, E., and Tulchinsky, E. (1998). Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol* *18*, 7095-7105.

LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* *11*, 847-862.

Laban, C., Bustin, S.A., and Jenkins, P.J. (2003). The GH-IGF-I axis and breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* *14*, 28-34.

Lamb, J.A., Ventura, J.J., Hess, P., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2003). JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell* *11*, 1479-1489.

Lambert, P.F., Ludford-Menting, M.J., Deacon, N.J., Kola, I., and Doherty, R.R. (1997). The *nfkb1* promoter is controlled by proteins of the Ets family. *Mol Biol Cell* *8*, 313-323.

Lamothe, B., Bucchini, D., Jami, J., and Joshi, R.L. (1995). Interaction of p85 subunit of PI 3-kinase with insulin and IGF-1 receptors analysed by using the two-hybrid system. *FEBS Lett* *373*, 51-55.

Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* *97*, 17-27.

Larsson, O., Girnita, A., and Girnita, L. (2005). Role of insulin-like growth factor 1 receptor signalling in cancer. *Br J Cancer* *92*, 2097-2101.

LaRue, K.E., Khalil, M., and Freyer, J.P. (2004). Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Cancer Res* *64*, 1621-1631.

Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzl, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., *et al.* (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 2920-2925.

Lawlor, E.R., Scheel, C., Irving, J., and Sorensen, P.H. (2002). Anchorage-independent multicellular spheroids as an in vitro model of growth signaling in Ewing tumors. *Oncogene* *21*, 307-318.

- Lawlor, M.A., and Rotwein, P. (2000). Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Cell Biol* 20, 8983-8995.
- Lebeau, M.C., Massol, N., Herrick, J., Faber, L.E., Renoir, J.M., Radanyi, C., and Baulieu, E.E. (1992). p59, an hsp 90-binding protein. Cloning and sequencing of its cDNA and preparation of a peptide-directed polyclonal antibody. *J Biol Chem* 267, 4281-4284.
- Lee, A.V., Jackson, J.G., Gooch, J.L., Hilsenbeck, S.G., Coronado-Heinsohn, E., Osborne, C.K., and Yee, D. (1999). Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 13, 787-796.
- Lee, A.V., and Yee, D. (1995). Insulin-like growth factors and breast cancer. *Biomed Pharmacother* 49, 415-421.
- Lee, F.S., Peters, R.T., Dang, L.C., and Maniatis, T. (1998a). MEKK1 activates both I $\kappa$ B kinase alpha and I $\kappa$ B kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9319-9324.
- Lee, M.S., Gippert, G.P., Soman, K.V., Case, D.A., and Wright, P.E. (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* 245, 635-637.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Na, S.Y., Kim, T.S., Choi, H.S., Im, S.Y., and Lee, J.W. (1998b). Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivations through interaction with the c-Jun and c-Fos subunits. *J Biol Chem* 273, 16651-16654.
- Leek, R.D., Stratford, I., and Harris, A.L. (2005). The role of hypoxia-inducible factor-1 in three-dimensional tumor growth, apoptosis, and regulation by the insulin-signaling pathway. *Cancer Res* 65, 4147-4152.
- Lees, J.A., Fawell, S.E., White, R., and Parker, M.G. (1990). A 22-amino-acid peptide restores DNA-binding activity to dimerization-defective mutants of the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 10, 5529-5531.
- Lefebvre, O., Chenard, M.P., Masson, R., Linares, J., Dierich, A., LeMeur, M., Wendling, C., Tomasetto, C., Chambon, P., and Rio, M.C. (1996). Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science* 274, 259-262.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C.T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16, 143-163.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (1998). Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 58, 3197-3201.
- Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8479-8484.
- Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E.B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *Embo J* 13, 4070-4079.
- Li, X.R., Chong, A.S., Wu, J., Roebuck, K.A., Kumar, A., Parrillo, J.E., Rapp, U.R., Kimberly, R.P., Williams, J.W., and Xu, X. (1999). Transcriptional regulation of Fas gene expression by GA-binding protein and AP-1 in T cell antigen receptor.CD3 complex-stimulated T cells. *J Biol Chem* 274, 35203-35210.
- Lin, R.Z., Chou, L.F., Chien, C.C., and Chang, H.Y. (2006). Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and beta1-integrin. *Cell Tissue Res* 324, 411-422.
- Ling, L., Cao, Z., and Goeddel, D.V. (1998). NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3792-3797.
- Liu, S.H., and Ng, S.Y. (1994). Serum response factor associated ETS proteins: ternary complex factors and PEA3-binding factor. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 1406-1413.

Liu, Y., Ludes-Meyers, J., Zhang, Y., Munoz-Medellin, D., Kim, H.T., Lu, C., Ge, G., Schiff, R., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., *et al.* (2002). Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene* *21*, 7680-7689.

Lopez, G.N., Turck, C.W., Schaufele, F., Stallcup, M.R., and Kushner, P.J. (2001). Growth factors signal to steroid receptors through mitogen-activated protein kinase regulation of p160 coactivator activity. *J Biol Chem* *276*, 22177-22182.

Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., and Pollak, M. (2004). Overexpression of ErbB2 receptor inhibits IGF-I-induced Shc-MAPK signaling pathway in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *313*, 709-715.

Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 11162-11166.

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

Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* *21*, 115-137.

Manolagas, S.C., Kousteni, S., and Jilka, R.L. (2002). Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* *57*, 385-409.

Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* *272*, 4378-4383.

Marconcini, L., Marchio, S., Morbidelli, L., Cartocci, E., Albini, A., Ziche, M., Bussolino, F., and Oliviero, S. (1999). c-fos-induced growth factor/vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9671-9676.

Martin, M.B., Franke, T.F., Stoica, G.E., Chambon, P., Katzenellenbogen, B.S., Stoica, B.A., McLemore, M.S., Olivo, S.E., and Stoica, A. (2000). A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* *141*, 4503-4511.

Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X., Rio, M.C., and Dante, R. (1995). Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene* *157*, 261-264.

Martin, V., Ribieras, S., Song-Wang, X.G., Lasne, Y., Frappart, L., Rio, M.C., and Dante, R. (1997). Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem* *65*, 95-106.

Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., Kato, S., and Kawashima, H. (1998). A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun* *246*, 142-147.

Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., and Chambon, P. (1982). Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* *10*, 7895-7903.

Matthews, R.J., Bowne, D.B., Flores, E., and Thomas, M.L. (1992). Characterization of hematopoietic intracellular protein tyrosine phosphatases: description of a phosphatase containing an SH2 domain and another enriched in proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich sequences. *Mol Cell Biol* *12*, 2396-2405.

- Maul, R.S., Zhang, H., Reid, J.D.t., Pedigo, N.G., and Kaetzel, D.M. (1998). Identification of a cell type-specific enhancer in the distal 5'-region of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol Chem* *273*, 33239-33246.
- Mavrothalassitis, G., and Ghysdael, J. (2000). Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene* *19*, 6524-6532.
- Mayo, L.D., and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11598-11603.
- McCarthy, S.A., Chen, D., Yang, B.S., Garcia Ramirez, J.J., Cherwinski, H., Chen, X.R., Klagsbrun, M., Hauser, C.A., Ostrowski, M.C., and McMahon, M. (1997). Rapid phosphorylation of Ets-2 accompanies mitogen-activated protein kinase activation and the induction of heparin-binding epidermal growth factor gene expression by oncogenic Raf-1. *Mol Cell Biol* *17*, 2401-2412.
- McCormick, F. (1993). Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* *363*, 15-16.
- McCubrey, J.A., May, W.S., Duronio, V., and Mufson, A. (2000). Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* *14*, 9-21.
- McDonnell, D.P., and Norris, J.D. (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* *296*, 1642-1644.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Kronen, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., *et al.* (1998a). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* *12*, 3357-3368.
- McInerney, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S., and Katzenellenbogen, B.S. (1998b). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* *139*, 4513-4522.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* *20*, 321-344.
- McKenna, N.J., and O'Malley, B.W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* *108*, 465-474.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., and Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* *404*, 782-787.
- Meng, X., Devin, J., Sullivan, W.P., Toft, D., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1996). Mutational analysis of Hsp90 alpha dimerization and subcellular localisation: dimer disruption does not impede 'in vivo' interaction with estrogen receptor. *Journal of Cell Science* *109*, 1677-1687.
- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* *115*, 751-763.
- Metivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hubner, M.R., Brand, H., Penot, G., Manu, D., Denger, S., Reid, G., Kos, M., *et al.* (2002). A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* *10*, 1019-1032.
- Meyer-ter-Vehn, T., Covacci, A., Kist, M., and Pahl, H.L. (2000). Helicobacter pylori activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-jun. *J Biol Chem* *275*, 16064-16072.
- Meyer, M.E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D., and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* *57*, 433-442.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* 15, 1292-1300.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Green, S., de Falco, A., Kajtaniak, E.L., Blasi, F., Chambon, P., and Auricchio, F. (1989). Phosphorylation on tyrosine of in vitro synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding. *Mol Endocrinol* 3, 1061-1069.

Migliaccio, A., Pagano, M., and Auricchio, F. (1993). Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells. *Oncogene* 8, 2183-2191.

Mikula, M., Schreiber, M., Husak, Z., Kucerova, L., Ruth, J., Wieser, R., Zatloukal, K., Beug, H., Wagner, E.F., and Baccarini, M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* 20, 1952-1962.

Molloy, C.A., May, F.E., and Westley, B.R. (2000). Insulin receptor substrate-1 expression is regulated by estrogen in the MCF-7 human breast cancer cell line. *J Biol Chem* 275, 12565-12571.

Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9, 814-825.

Moodie, S.A., and Wolfman, A. (1994). The 3Rs of life: Ras, Raf and growth regulation. *Trends Genet* 10, 44-48.

Morgillo, F., Woo, J.K., Kim, E.S., Hong, W.K., and Lee, H.Y. (2006). Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res* 66, 10100-10111.

Morrione, A., Valentini, B., Li, S., Ooi, J.Y., Margolis, B., and Baserga, R. (1996). Grb10: A new substrate of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res* 56, 3165-3167.

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

Muller-Holzner, E., Marth, C., Zeimet, A.G., Hofstadter, F., and Daxenbichler, G. (1996). Effects of sex- and glucocorticoid steroids on breast cancer cells grown as either multicellular tumor spheroids or monolayers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58, 13-19.

Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.H., Fingar, D.C., and Blenis, J. (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* 4, 556-564.

Musatov, S., Chen, W., Pfaff, D.W., Kaplitt, M.G., and Ogawa, S. (2006). RNAi-mediated silencing of estrogen receptor  $\alpha$  in the ventromedial nucleus of hypothalamus abolishes female sexual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10456-10460.

Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (1993). Acute effects of growth factors on T-47D breast cancer cell cycle progression. *Eur J Cancer* 29A, 2273-2279.

Muthusamy, N., and Leiden, J.M. (1998). A protein kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent signal transduction pathway activates the cAMP-responsive element-binding protein transcription factor following T cell receptor engagement. *J Biol Chem* 273, 22841-22847.

Myers, M.G., Jr., Grammer, T.C., Wang, L.M., Sun, X.J., Pierce, J.H., Blenis, J., and White, M.F. (1994). Insulin receptor substrate-1 mediates phosphatidylinositol 3'-kinase and p70S6k signaling during insulin, insulin-like growth factor-1, and interleukin-4 stimulation. *J Biol Chem* 269, 28783-28789.

Nagata, D., Suzuki, E., Nishimatsu, H., Satonaka, H., Goto, A., Omata, M., and Hirata, Y. (2001). Transcriptional activation of the cyclin D1 gene is mediated by multiple cis-elements, including SP1 sites and a cAMP-responsive element in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 662-669.

- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Lee, C.G., Hurwitz, J., Parvin, J.D., and Montminy, M. (1997a). RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* *90*, 1107-1112.
- Nakajima, T., Uchida, C., Anderson, S.F., Parvin, J.D., and Montminy, M. (1997b). Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. *Genes Dev* *11*, 738-747.
- Nakano, H., Shindo, M., Sakon, S., Nishinaka, S., Mihara, M., Yagita, H., and Okumura, K. (1998). Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 3537-3542.
- Nasi, S., Ciarapica, R., Jucker, R., Rosati, J., and Soucek, L. (2001). Making decisions through Myc. *FEBS Lett* *490*, 153-162.
- Nave, B.T., Ouwens, M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Shepherd, P.R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* *344 Pt 2*, 427-431.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 1858-1862.
- Nichols, M., Rientjes, J.M., and Stewart, A.F. (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*, 765-773.
- Nicholson, R.I., and Gee, J.M. (2000). Oestrogen and growth factor cross-talk and endocrine insensitivity and acquired resistance in breast cancer. *Br J Cancer* *82*, 501-513.
- Niklinski, J., Claassen, G., Meyers, C., Gregory, M.A., Allegra, C.J., Kaye, F.J., Hann, S.R., and Zajac-Kaye, M. (2000). Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. *Mol Cell Biol* *20*, 5276-5284.
- Nimer, S., Zhang, J., Avraham, H., and Miyazaki, Y. (1996). Transcriptional regulation of interleukin-3 expression in megakaryocytes. *Blood* *88*, 66-74.
- Nirmala, P.B., and Thampan, R.V. (1995). Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* *213*, 24-31.
- Novaro, V., Roskelley, C.D., and Bissell, M.J. (2003). Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor alpha expression and function in mouse mammary epithelial cells. *J Cell Sci* *116*, 2975-2986.
- Nunez, A.M., Berry, M., Imler, J.L., and Chambon, P. (1989). The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *Embo J* *8*, 823-829.
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1999). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12887-12892.
- Ogawa, S., Chester, A.E., Hewitt, S.C., Walker, V.R., Gustafsson, J.A., Smithies, O., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (2000). Abolition of male sexual behaviors in mice lacking estrogen receptors alpha and beta (alpha beta ERKO). *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 14737-14741.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1998a). Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* *139*, 5070-5081.



- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998b). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26, 3505-3512.
- Ogawa, S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Pfaff, D.W. (1996). Reversal of sex roles in genetic female mice by disruption of estrogen receptor gene. *Neuroendocrinology* 64, 467-470.
- Okazaki, K., and Sagata, N. (1995). The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *Embo J* 14, 5048-5059.
- Olea, N., Villalobos, M., Nunez, M.I., Elvira, J., Ruiz de Almodovar, J.M., and Pedraza, V. (1994). Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models. *Cell Prolif* 27, 213-223.
- Olea, N., Villalobos, M., Ruiz de Almodovar, J.M., and Pedraza, V. (1992). MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *Int J Cancer* 50, 112-117.
- Omoto, Y., Inoue, S., Ogawa, S., Toyama, T., Yamashita, H., Muramatsu, M., Kobayashi, S., and Iwase, H. (2001). Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett* 163, 207-212.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Osborne, C.K., Clemmons, D.R., and Arteaga, C.L. (1990). Regulation of breast cancer growth by insulin-like growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37, 805-809.
- Paganini-Hill, A. (1996). Oestrogen replacement therapy and Alzheimer's disease. *Br J Obstet Gynaecol* 103 Suppl 13, 80-86.
- Paik, S. (1992). Expression of IGF-I and IGF-II mRNA in breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 22, 31-38.
- Park, Y.G., Nesterova, M., Agrawal, S., and Cho-Chung, Y.S. (1999). Dual blockade of cyclic AMP response element- (CRE) and AP-1-directed transcription by CRE-transcription factor decoy oligonucleotide. gene-specific inhibition of tumor growth. *J Biol Chem* 274, 1573-1580.
- Passegue, E., Jochum, W., Schorpp-Kistner, M., Mohle-Steinlein, U., and Wagner, E.F. (2001). Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage. *Cell* 104, 21-32.
- Passegue, E., and Wagner, E.F. (2000). JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *Embo J* 19, 2969-2979.
- Patrone, C., Ma, Z.Q., Pollio, G., Agrati, P., Parker, M.G., and Maggi, A. (1996). Cross-coupling between insulin and estrogen receptor in human neuroblastoma cells. *Mol Endocrinol* 10, 499-507.
- Pellicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., and Pelicci, P.G. (1992). A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.
- Pellicci, G., Lanfrancone, L., Salcini, A.E., Romano, A., Mele, S., Grazia Borrello, M., Segatto, O., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (1995). Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. *Oncogene* 11, 899-907.
- Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-5320.
- Perez-Roger, I., Solomon, D.L., Sewing, A., and Land, H. (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* 14, 2373-2381.

Perks, C.M., and Holly, J.M. (2000). Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 75-84.

Peyrat, J.P., Bonnetterre, J., Hecquet, B., Vennin, P., Louchez, M.M., Fournier, C., Lefebvre, J., and Demaille, A. (1993). Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. *Eur J Cancer* 29A, 492-497.

Pfarr, C.M., Mechta, F., Spyrou, G., Lallemand, D., Carillo, S., and Yaniv, M. (1994). Mouse JunD negatively regulates fibroblast growth and antagonizes transformation by ras. *Cell* 76, 747-760.

Philips, A., Chalbos, D., and Rochefort, H. (1993). Estradiol increases and anti-estrogens antagonize the growth factor-induced activator protein-1 activity in MCF7 breast cancer cells without affecting c-fos and c-jun synthesis. *J Biol Chem* 268, 14103-14108.

Philips, A., Teyssier, C., Galtier, F., Rivier-Covas, C., Rey, J.M., Rochefort, H., and Chalbos, D. (1998). FRA-1 expression level modulates regulation of activator protein-1 activity by estradiol in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 12, 973-985.

Planas-Silva, M.D., and Weinberg, R.A. (1997). Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. *Mol Cell Biol* 17, 4059-4069.

Playford, R.J., Marchbank, T., Goodlad, R.A., Chinery, R.A., Poulson, R., and Hanby, A.M. (1996). Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2137-2142.

Polshakov, V.I., Williams, M.A., Gargaro, A.R., Frenkiel, T.A., Westley, B.R., Chadwick, M.P., May, F.E., and Feeney, J. (1997). High-resolution solution structure of human pNR-2/pS2: a single trefoil motif protein. *J Mol Biol* 267, 418-432.

Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.

Pourreau-Schneider, N., Berthois, Y., Mittre, H., Charpin, C., Jacquemier, J., and Martin, P.M. (1984). Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and in suspension culture: promotion of morphological heterogeneity, modulation of progestin receptor induction; cell-substrate interactions on collagen gels. *J Steroid Biochem* 21, 763-771.

Prall, O.W., Rogan, E.M., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. (1998). c-Myc or cyclin D1 mimics estrogen effects on cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 18, 4499-4508.

Prall, O.W., Sarcevic, B., Musgrove, E.A., Watts, C.K., and Sutherland, R.L. (1997). Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem* 272, 10882-10894.

Premkumar, D.R., Adhikary, G., Overholt, J.L., Simonson, M.S., Cherniack, N.S., and Prabhakar, N.R. (2000). Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1. *Adv Exp Med Biol* 475, 101-109.

Prendergast, G.C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967-2987.

Price, M.A., Cruzalegui, F.H., and Treisman, R. (1996). The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate Ternary Complex Factors and c-fos transcription in response to UV light. *Embo J* 15, 6552-6563.

Pugazhenth, S., Miller, E., Sable, C., Young, P., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., and Reusch, J.E. (1999). Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 274, 27529-27535.

Pujol, P., Rey, J.M., Nirde, P., Roger, P., Gastaldi, M., Laffargue, F., Rochefort, H., and Maudelonde, T. (1998). Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 5367-5373.

- Pulverer, B.J., Fisher, C., Vousden, K., Littlewood, T., Evan, G., and Woodgett, J.R. (1994). Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene* 9, 59-70.
- Ramsey, T.L., and Klinge, C.M. (2001). Estrogen response element binding induces alterations in estrogen receptor-alpha conformation as revealed by susceptibility to partial proteolysis. *J Mol Endocrinol* 27, 275-292.
- Ratajczak, T., Carrello, A., Mark, P.J., Warner, B.J., Simpson, R.J., Moritz, R.L., and House, A.K. (1993). The cyclophilin component of the unactivated estrogen receptor contains a tetratricopeptide repeat domain and shares identity with p59 (FKBP59). *J Biol Chem* 268, 13187-13192.
- Redeuilh, G., Moncharmont, B., Secco, C., and Baulieu, E.E. (1987). Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. *JBiolChem* 262, 6969-6975.
- Reichmann, E., Schwarz, H., Deiner, E.M., Leitner, I., Eilers, M., Berger, J., Busslinger, M., and Beug, H. (1992). Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 71, 1103-1116.
- Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11, 695-707.
- Reisman, D., Elkind, N.B., Roy, B., Beamon, J., and Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ* 4, 57-65.
- Renoir, J.M., Radanyi, C., Faber, L.E., and Baulieu, E.E. (1990). The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J Biol Chem* 265, 10740-10745.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17, 1030-1032.
- Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, L.J., 3rd (1998). A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 13, 763-773.
- Riggs, B.L., Khosla, S., and Melton, L.J., 3rd (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279-302.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1976a). Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4379-4381.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1976b). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2365-2369.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978a). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253, 2769-2776.
- Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978b). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89, 283-286.
- Rio, M.C., Bellocq, J.P., Daniel, J.Y., Tomasetto, C., Lathe, R., Chenard, M.P., Batzenschlager, A., and Chambon, P. (1988). Breast cancer-associated pS2 protein: synthesis and secretion by normal stomach mucosa. *Science* 241, 705-708.

Rissman, E.F., Early, A.H., Taylor, J.A., Korach, K.S., and Lubahn, D.B. (1997). Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology* 138, 507-510.

Rodrigues, S., Rodrigue, C.M., Attoub, S., Flejou, J.F., Bruyneel, E., Bracke, M., Emami, S., and Gespach, C. (2006). Induction of the adenoma-carcinoma progression and Cdc25A-B phosphatases by the trefoil factor TFF1 in human colon epithelial cells. *Oncogene* 25, 6628-6636.

Rogatsky, I., Trowbridge, J.M., and Garabedian, M.J. (1999). Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274, 22296-22302.

Roger, P., Sahla, M.E., Makela, S., Gustafsson, J.A., Baldet, P., and Rochefort, H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61, 2537-2541.

Romashkova, J.A., and Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* 401, 86-90.

Rommel, C., Bodine, S.C., Clarke, B.A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3, 1009-1013.

Rowan, B.G., Weigel, N.L., and O'Malley, B.W. (2000). Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 275, 4475-4483.

Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T., and Roeder, R.G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* 365, 359-361.

Roy, B., Beamon, J., Balint, E., and Reisman, D. (1994). Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53 expression in some tumors. *Mol Cell Biol* 14, 7805-7815.

Ruan, W., and Kleinberg, D.L. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology* 140, 5075-5081.

Saceda, M., Lippman, M.E., Lindsey, R.K., Puente, M., and Martin, M.B. (1989). Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Mol Endocrinol* 3, 1782-1787.

Sachdev, D., and Yee, D. (2001). The IGF system and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8, 197-209.

Safe, S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62, 231-252.

Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T., and Toriumi, W. (1999). I-kappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* 274, 30353-30356.

Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* 18, 717-726.

Salmon, W.D., Jr., and Daughaday, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49, 825-836.

Salomonsson, M., Haggblad, J., O'Malley, B.W., and Sitbon, G.M. (1994). The human estrogen receptor hormone binding domain dimerizes independently of ligand activation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48, 447-452.

Sar, M., and Welsch, F. (1999). Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology* 140, 963-971.

Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56, 502-514.

Schiff, R., Massarweh, S.A., Shou, J., Bharwani, L., Mohsin, S.K., and Osborne, C.K. (2004). Cross-talk between estrogen receptor and growth factor pathways as a molecular target for overcoming endocrine resistance. *Clin Cancer Res* *10*, 331S-336S.

Schmidt, E.V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* *18*, 2988-2996.

Schmitz, M.L., Bacher, S., and Kracht, M. (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* *26*, 186-190.

Schmitz, M.L., and Baeuerle, P.A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *Embo J* *10*, 3805-3817.

Schonthal, A., Herrlich, P., Rahmsdorf, H.J., and Ponta, H. (1988). Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* *54*, 325-334.

Schorpp-Kistner, M., Wang, Z.Q., Angel, P., and Wagner, E.F. (1999). JunB is essential for mammalian placentation. *Embo J* *18*, 934-948.

Schouten, G.J., Vertegaal, A.C., Whiteside, S.T., Israel, A., Toebes, M., Dorsman, J.C., van der Eb, A.J., and Zantema, A. (1997). IkappaB alpha is a target for the mitogen-activated 90 kDa ribosomal S6 kinase. *Embo J* *16*, 3133-3144.

Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., and Wagner, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* *13*, 607-619.

Schwabe, J.W., Neuhaus, D., and Rhodes, D. (1990). Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* *348*, 458-461.

Schwabe, J.W.R., Chapman, L., Fintch, J.T., and Rhodes, D. (1993). The cristal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* *75*, 567-578.

Schwartz, J.A., Zhong, L., Deighton-Collins, S., Zhao, C., and Skafar, D.F. (2002). Mutations targeted to a predicted helix in the extreme carboxyl-terminal region of the human estrogen receptor-alpha alter its response to estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *J Biol Chem* *277*, 13202-13209.

Segnitz, B., and Gehring, U. (1995). Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *ProcNatAcadSciUSA* *92*, 2179-2183.

Seiler-tuyns, A., Walker, P., Martinez, E., Merillat, A.M., Givel, F., and Walhi, W. (1986). Identification of the estrogen-responsive DNA sequences by transient expression experiments in a human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Research* *14*, 8755-8770.

Sentis, S., Le Romancer, M., Bianchin, C., Rostan, M.C., and Corbo, L. (2005). Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* *19*, 2671-2684.

Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* *3*, 400-408.

Sevilla, L., Aperlo, C., Dulic, V., Chambard, J.C., Boutonnet, C., Pasquier, O., Pognonec, P., and Boulukos, K.E. (1999). The Ets2 transcription factor inhibits apoptosis induced by colony-stimulating factor 1 deprivation of macrophages through a Bcl-xL-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* *19*, 2624-2634.

Sewack, G.F., and Hansen, U. (1997). Nucleosome positioning and transcription-associated chromatin alterations on the human estrogen-responsive pS2 promoter. *J Biol Chem* *272*, 31118-31129.

Shang, Y., and Brown, M. (2002). Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* *295*, 2465-2468.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* *103*, 843-852.

Shaulian, E., and Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20, 2390-2400.

Shen, S.-H., Bastien, L., Posner, B.I., and Chretien, P. (1991). A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases. *Nature* 352, 736-739.

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.

Shimizu, M., Nomura, Y., Suzuki, H., Ichikawa, E., Takeuchi, A., Suzuki, M., Nakamura, T., Nakajima, T., and Oda, K. (1998). Activation of the rat cyclin A promoter by ATF2 and Jun family members and its suppression by ATF4. *Exp Cell Res* 239, 93-103.

Shou, J., Massarweh, S., Osborne, C.K., Wakeling, A.E., Ali, S., Weiss, H., and Schiff, R. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 96, 926-935.

Shughrue, P.J., Lane, M.V., and Merchenthaler, I. (1999). Biologically active estrogen receptor-beta: evidence from in vivo autoradiographic studies with estrogen receptor alpha-knockout mice. *Endocrinology* 140, 2613-2620.

Shughrue, P.J., and Merchenthaler, I. (2000). Estrogen is more than just a "sex hormone": novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front Neuroendocrinol* 21, 95-101.

Shumaker, S.A., Legault, C., Rapp, S.R., Thal, L., Wallace, R.B., Ockene, J.K., Hendrix, S.L., Jones, B.N., 3rd, Assaf, A.R., Jackson, R.D., *et al.* (2003). Estrogen plus progestin and the incidence of dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. *Jama* 289, 2651-2662.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D.P., Ley, K., Chin, W.W., and Liao, J.K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.

Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (2004). Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25, 45-71.

Soucie, E.L., Annis, M.G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D.W., and Penn, L.Z. (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol* 21, 4725-4736.

Speirs, V., Malone, C., Walton, D.S., Kerin, M.J., and Atkin, S.L. (1999). Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Res* 59, 5421-5424.

St. Croix, B., Florenes, V.A., Rak, J.W., Flanagan, M., Bhattacharya, N., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1996). Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2, 1204-1210.

Stallcup, M.R., Chen, D., Koh, S.S., Ma, H., Lee, Y.H., Li, H., Schurter, B.T., and Aswad, D.W. (2000). Co-operation between protein-acetylating and protein-methylating co-activators in transcriptional activation. *Biochem Soc Trans* 28, 415-418.

Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., *et al.* (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3, 392-399.

Stebbins, C.E., Russo, A.A., Schneider, C., Rosen, N., Hartl, U.F., and Pavletich, N.P. (1997). Crystal structure of an Hsp90-geldamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 89, 239-250.

- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F., and Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 277, 567-570.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L., and Dang, M. (2001). Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microsc Res Tech* 52, 171-181.
- Sturgill, T.W., and Ray, L.B. (1986). Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 134, 565-571.
- Surmacz, E., Guvakova, M.A., Nolan, M.K., Nicosia, R.F., and Sciacca, L. (1998). Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 47, 255-267.
- Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184.
- Szatkowski Ozers, M., Hill, J.J., Ervin, K., Wood, J.R., Nardulli, A.M., Royer, C.A., and Gorski, J. (1997). Equilibrium Binding of estrogen receptor with DNA using fluorescence anisotropy. *J Biol Chem* 272, 30405-30411.
- Takahashi, T., Ohmichi, M., Kawagoe, J., Ohshima, C., Doshida, M., Ohta, T., Saitoh, M., Mori-Abe, A., Du, B., Igarashi, H., *et al.* (2005). Growth factors change nuclear distribution of estrogen receptor-alpha via mitogen-activated protein kinase or phosphatidylinositol 3-kinase cascade in a human breast cancer cell line. *Endocrinology* 146, 4082-4089.
- Tamir, A., Howard, J., Higgins, R.R., Li, Y.J., Berger, L., Zacksenhaus, E., Reis, M., and Ben-David, Y. (1999). Fli-1, an Ets-related transcription factor, regulates erythropoietin-induced erythroid proliferation and differentiation: evidence for direct transcriptional repression of the Rb gene during differentiation. *Mol Cell Biol* 19, 4452-4464.
- Tamrazi, A., Carlson, K.E., Daniels, J.R., Hurth, K.M., and Katzenellenbogen, J.A. (2002a). Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol Endocrinol* 16, 2706-2719.
- Tamrazi, A., Carlson, K.E., Daniels, J.R., Hurth, K.M., and Katzenellenbogen, J.A. (2002b). Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. *Mol Endocrinol* 16, 2706-2719.
- Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., and Mayeux, R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-432.
- Tanos, T., Marinissen, M.J., Leskow, F.C., Hochbaum, D., Martinetto, H., Gutkind, J.S., and Coso, O.A. (2005). Phosphorylation of c-Fos by members of the p38 MAPK family. Role in the AP-1 response to UV light. *J Biol Chem* 280, 18842-18852.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M., and Nishida, E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *Embo J* 20, 466-479.
- Taylor, A.H., and Al-Azzawi, F. (2000). Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 24, 145-155.
- Teyssier, C., Belguise, K., Galtier, F., and Chalbos, D. (2001). Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J Biol Chem* 276, 36361-36369.
- Thepot, D., Weitzman, J.B., Barra, J., Segretain, D., Stinnakre, M.G., Babinet, C., and Yaniv, M. (2000). Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development* 127, 143-153.
- Toft, D., and Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 55, 1574-1581.

Toft, D.J., Rosenberg, S.B., Bergers, G., Volpert, O., and Linzer, D.I. (2001). Reactivation of proliferin gene expression is associated with increased angiogenesis in a cell culture model of fibrosarcoma tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13055-13059.

Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitononkov, A., Imyanitov, E., Ullrich, A., and Böhmer, F.-D. (1995). Association of SH2 Domain Protein Tyrosine Phosphatases with the Epidermal Growth Factor Receptor in Human Tumor Cells. *J Biol Chem* *270*, 21277-21284.

Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., and Chambon, P. (1989a). The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *Embo J* *8*, 1981-1986.

Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., and Chambon, P. (1989b). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* *59*, 477-487.

Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* *387*, 677-684.

Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* *3*, 513-519.

Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* *11*, 353-365.

Truss, M., and Beato, M. (1998). Steroid hormone receptors: interactions with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews* *14*, 459-479.

Trust, T.J., Kostrzynska, M., Emody, L., and Wadstrom, T. (1993). High-affinity binding of the basement membrane protein collagen type IV to the crystalline virulence surface protein array of *Aeromonas salmonicida*. *Mol Microbiol* *7*, 593-600.

Ullrich, A., Gray, A., Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., Chen, E., *et al.* (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *Embo J* *5*, 2503-2512.

van Dam, H., and Castellazzi, M. (2001). Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* *20*, 2453-2464.

van der Burg, B., Rutteman, G.R., Blankenstein, M.A., de Laat, S.W., and van Zoelen, E.J. (1988). Mitogenic stimulation of human breast cancer cells in a growth factor-defined medium: synergistic action of insulin and estrogen. *J Cell Physiol* *134*, 101-108.

Vandel, L., Pfarr, C.M., Huguier, S., Loiseau, L., Sergeant, A., and Castellazzi, M. (1995). Increased transforming activity of JunB and JunD by introduction of an heterologous homodimerization domain. *Oncogene* *10*, 495-507.

Vanhaesebroeck, B., and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* *346 Pt 3*, 561-576.

Vanhoutte, P., Barnier, J.V., Guibert, B., Pages, C., Besson, M.J., Hipskind, R.A., and Caboche, J. (1999). Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices. *Mol Cell Biol* *19*, 136-146.

Venanzoni, M.C., Robinson, L.R., Hodge, D.R., Kola, I., and Seth, A. (1996). ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene* *12*, 1199-1204.

Vignon, F., Bouton, M.M., and Rochefort, H. (1987). Antiestrogens inhibit the mitogenic effect of growth factors on breast cancer cells in the total absence of estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* *146*, 1502-1508.



- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Vo, N., and Goodman, R.H. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 276, 13505-13508.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* 15, 3667-3675.
- Vogt, P.K. (2002). Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nat Rev Cancer* 2, 465-469.
- Volpi, A., De Paola, F., Nanni, O., Granato, A.M., Bajorko, P., Becciolini, A., Scarpi, E., Riccobon, A., Balzi, M., and Amadori, D. (2000). Prognostic significance of biologic markers in node-negative breast cancer patients: a prospective study. *Breast Cancer Res Treat* 63, 181-192.
- Wakeling, A.E., Dukes, M., and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51, 3867-3873.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M., *et al.* (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7889-7893.
- Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., *et al.* (2001a). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276, 18375-18383.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., and Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683.
- Wang, D., and Baldwin, A.S., Jr. (1998). Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J Biol Chem* 273, 29411-29416.
- Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L., and Baldwin, A.S., Jr. (2000). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* 275, 32592-32597.
- Wang, F., Hansen, R.K., Radisky, D., Yoneda, T., Barcellos-Hoff, M.H., Petersen, O.W., Turley, E.A., and Bissell, M.J. (2002). Phenotypic reversion or death of cancer cells by altering signaling pathways in three-dimensional contexts. *J Natl Cancer Inst* 94, 1494-1503.
- Wang, L., Andersson, S., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2001b). Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2792-2796.
- Wang, Y., and Prywes, R. (2000). Activation of the c-fos enhancer by the erk MAP kinase pathway through two sequence elements: the c-fos AP-1 and p62TCF sites. *Oncogene* 19, 1379-1385.
- Wang, Z.Q., Grigoriadis, A.E., Mohle-Steinlein, U., and Wagner, E.F. (1991). A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras. *Embo J* 10, 2437-2450.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211, 7-18.
- Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C., and Bissell, M.J. (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137, 231-245.

- Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., and Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9, 443-456.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., *et al.* (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol* 13, 1672-1685.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem* 275, 40782-40787.
- Weihua, Z., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2002). Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol Cell Endocrinol* 193, 1-5.
- Weitzman, J.B., Fiette, L., Matsuo, K., and Yaniv, M. (2000). JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* 6, 1109-1119.
- Werner, H., Woloschack, M., Stannard, B., Shen-Orr, Z., Roberts, C., and LeRoith, D. (1991). The insulin-like growth factor receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. In *Insulin-like growth factors: molecular and cellular aspects*, LeRoith D, ed. (Boca Raton, CRC Press), pp. p.18–48.
- Whang, H., Peters, G.A., Zeng, X., Tang, M., Ip, W., and Khan, S.A. (1995). Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerization is ligand-dependent in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270, 23322-23329.
- White, R., Sjoberg, M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *Embo J* 16, 1427-1435.
- Whiteside, S.T., and Israel, A. (1997). I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 8, 75-82.
- Whitfield, J., Neame, S.J., Paquet, L., Bernard, O., and Ham, J. (2001). Dominant-negative c-Jun promotes neuronal survival by reducing BIM expression and inhibiting mitochondrial cytochrome c release. *Neuron* 29, 629-643.
- Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D., and Davis, R.J. (1995). Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269, 403-407.
- Wilson, B.E., Mochon, E., and Boxer, L.M. (1996). Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis. *Mol Cell Biol* 16, 5546-5556.
- Wisdom, R., Johnson, R.S., and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J* 18, 188-197.
- Wood, J.R., Greene, G.L., and Nardulli, A.M. (1998). Estrogen response elements function as allosteric modulators of estrogen receptor conformation. *Mol Cell Biol* 18, 1927-1934.
- Wood, J.R., Likhite, V.S., Loven, M.A., and Nardulli, A.M. (2001). Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 15, 1114-1126.
- Wu, R.C., Qin, J., Hashimoto, Y., Wong, J., Xu, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2002). Regulation of SRC-3 (pCIP/ACTR/AIB-1/RAC-3/TRAM-1) Coactivator activity by I kappa B kinase. *Mol Cell Biol* 22, 3549-3561.
- Wu, R.C., Qin, J., Yi, P., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (2004). Selective phosphorylations of the SRC-3/AIB1 coactivator integrate genomic responses to multiple cellular signaling pathways. *Mol Cell* 15, 937-949.
- Xing, J., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959-963.

Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* *107*, 135-142.

Yan, J., Yu, C.T., Ozen, M., Ittmann, M., Tsai, S.Y., and Tsai, M.J. (2006). Steroid receptor coactivator-3 and activator protein-1 coordinately regulate the transcription of components of the insulin-like growth factor/AKT signaling pathway. *Cancer Res* *66*, 11039-11046.

Yang, B.S., Hauser, C.A., Henkel, G., Colman, M.S., Van Beveren, C., Stacey, K.J., Hume, D.A., Maki, R.A., and Ostrowski, M.C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol Cell Biol* *16*, 538-547.

Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P., and Flavell, R.A. (1997). Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* *389*, 865-870.

Yang, S.H., Yates, P.R., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., and Sharrocks, A.D. (1998). The Elk-1 ETS-domain transcription factor contains a mitogen-activated protein kinase targeting motif. *Mol Cell Biol* *18*, 710-720.

Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., *et al.* (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* *20*, 1688-1702.

Yee, D. (2006). Targeting insulin-like growth factor pathways. *Br J Cancer* *94*, 465-468.

Ylikomi, T., Bocquel, M.T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J* *11*, 3681-3694.

Young, M.R., Li, J.J., Rincon, M., Flavell, R.A., Sathyanarayana, B.K., Hunziker, R., and Colburn, N. (1999). Transgenic mice demonstrate AP-1 (activator protein-1) transactivation is required for tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9827-9832.

Yu, J., Wjasow, C., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110alpha phosphatidylinositol 3'-kinase. Distinct roles for the n-terminal and c-terminal SH2 domains. *J Biol Chem* *273*, 30199-30203.

Yuan, L.W., and Gambée, J.E. (2000). Phosphorylation of p300 at serine 89 by protein kinase C. *J Biol Chem* *275*, 40946-40951.

Zandi, P.P., Carlson, M.C., Plassman, B.L., Welsh-Bohmer, K.A., Mayer, L.S., Steffens, D.C., and Breitner, J.C. (2002). Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *Jama* *288*, 2123-2129.

Zenz, R., Scheuch, H., Martin, P., Frank, C., Eferl, R., Kenner, L., Sibilias, M., and Wagner, E.F. (2003). c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev Cell* *4*, 879-889.

Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J.S., Behbehani, M., Tsien, J.Z., and Xu, M. (2002). c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* *30*, 416-420.

Zhang, M., Latham, D.E., Delaney, M.A., and Chakravarti, A. (2005). Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* *24*, 2474-2482.

Zhang, X., Wrzeszczynska, M.H., Horvath, C.M., and Darnell, J.E., Jr. (1999). Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol* *19*, 7138-7146.

Zhao, C., Matthews, J., Tujague, M., Wan, J., Strom, A., Toresson, G., Lam, E.W., Cheng, G., Gustafsson, J.A., and Dahlman-Wright, K. (2007). Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer Res* *67*, 3955-3962.

Zhong, H., Voll, R.E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* *1*, 661-671.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.

Zilliacus, J., Holter, E., Wakui, H., Tazawa, H., Treuter, E., and Gustafsson, J.A. (2001). Regulation of glucocorticoid receptor activity by 14-3-3-dependent intracellular relocalization of the corepressor RIP140. *Mol Endocrinol* 15, 501-511.