



HAL
open science

**Etude du rôle du facteur de transcription Pea3 pendant
la morphogenèse et la tumorigenèse mammaires :
caractérisation de ses propriétés pro-morphogènes et
pro-tumorigènes : étude des mécanismes moléculaires
associés**

Franck Ladam

► **To cite this version:**

Franck Ladam. Etude du rôle du facteur de transcription Pea3 pendant la morphogenèse et la tumorigenèse mammaires : caractérisation de ses propriétés pro-morphogènes et pro-tumorigènes : étude des mécanismes moléculaires associés. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S031 . tel-00605540

HAL Id: tel-00605540

<https://theses.hal.science/tel-00605540>

Submitted on 2 Jul 2011

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.

**UNIVERSITE LILLE 2-DROIT ET SANTE
FACULTE DE MEDECINE**

Ecole Doctorale Biologie-Santé Lille-Nord de France

THESE Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

**Discipline : ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA
BIOLOGIE**

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Franck LADAM

Le 23 Novembre 2010

**Etude du rôle du facteur de transcription Pea3 pendant la
morphogénèse et la tumorigénèse mammaires**

- **Caractérisation de ses propriétés pro-morphogènes et pro-tumorigènes**
- **Etude des mécanismes moléculaires associés**

Directeur de thèse

Dr Anne Chotteau-Lelièvre

Composition du jury :

Président :

Pr **Yvan de Launoit**, Institut de Biologie de Lille

Rapporteurs :

Dr **Rosita Winkler**, Université de Liège

Dr **Vincent Cavallès**, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier

Examineurs :

Dr **Guillemette Huet**, INSERM, Université de Lille2

Dr **Ivan Bièche**, Institut Curie Paris

Dr **Anne Chotteau-Lelièvre**, Institut de Biologie de Lille

RESUME

Les facteurs de transcription du groupe PEA3 (Pea3, Erm et Er81) font partie de la famille d'oncogènes ETS. Leur expression est souvent observée lors de la mise en place des organes par morphogenèse de branchement comme la glande mammaire. De plus, une expression aberrante de ces facteurs de transcription est corrélée au caractère cancéreux de nombreux organes comme le sein. Ainsi, l'expression d'Erm dans les tumeurs du sein est associée à un mauvais pronostic pour les patientes et celle de Pea3 constitue un marqueur de l'agressivité tumorale. Enfin, Pea3 module l'expression de gènes spécifiques. Même si certains de ces gènes sont déjà bien caractérisés beaucoup de choses restent à faire pour comprendre les mécanismes moléculaires régulés par Pea3.

Dans ce contexte lors de ma thèse je me suis intéressé au rôle du facteur de transcription Pea3 dans les processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires selon deux approches complémentaires :

- 1- l'étude des propriétés morphogénétiques modulées par Pea3 lors des étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires,
- 2- la recherche et la caractérisation de gènes régulés par Pea3 dans ce même contexte, par une analyse transcriptomique à grande échelle en utilisant des puces à ADN.

Au cours de ma thèse, nous avons ainsi pu montrer l'importance du facteur de transcription Pea3 dans le contrôle des propriétés de migration, d'invasion et de prolifération des cellules épithéliales mammaires normales TAC ou cancéreuses MMT. En parallèle, la recherche des gènes dont l'expression est régulée par Pea3 dans nos deux modèles cellulaires, a permis d'identifier de nombreux gènes capables de réguler la prolifération, la migration et l'invasion des cellules. Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés au gène *cycline d2*. Nous avons pu montrer que le gène *cycline d2* est un gène cible direct du facteur de transcription Pea3, qui module l'expression dans le modèle cellulaire TAC des deux transcrits (*cycline d2* et *cycline d2 trc*) issus de ce gène et décrits à ce jour. Enfin, l'étude de la fonction des protéines Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les cellules TAC ainsi que de leur relation fonctionnelle avec Pea3 a été entreprise.

Notre étude a ainsi permis de mieux définir l'implication du facteur de transcription Pea3 lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse de la glande mammaire. De plus, elle ouvre la réflexion sur le rôle du gène *cycline d2* lors de ces événements. La caractérisation des mécanismes moléculaires impliquant le facteur de transcription Pea3 pourra ainsi participer à la définition de potentielles nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement du cancer du sein.

Avant Propos

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit porte sur le rôle des facteurs de transcription du groupe PEA3 lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. La partie introductive est donc essentiellement basée sur les connaissances disponibles quant au modèle sur lequel nous travaillons, la glande mammaire, dans son contexte de développement normal par morphogenèse de branchement ou lors de la dérive tumorale ainsi que sur les connaissances à ce jour sur les facteurs de transcription du groupe PEA3 et leur rôle dans ce contexte. Ces facteurs de transcription sont aussi bien étudiés dans divers modèles lors du développement ou lors de la cancérisation de divers organes. Ces données disponibles dans la littérature sont présentées de façon non exhaustive et servent d'appui pour mieux comprendre les informations relatives au rôle des facteurs PEA3 dans les étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.

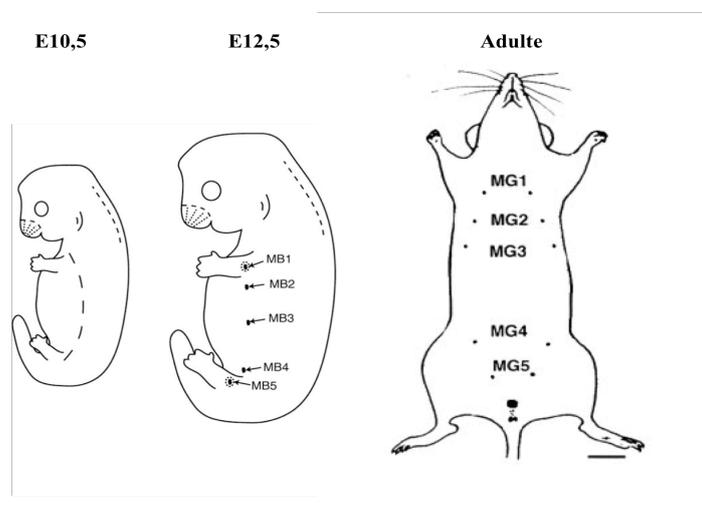


Figure 1. Position des cinq paires de glandes mammaires chez la souris. Au stade embryonnaire E10,5 deux crêtes mammaires se forment puis à E12,5 les cellules se regroupent et forment les placodes puis les bourgeons épithéliaux (MB). La souris femelle adulte possède 5 paires de glandes mammaires (MG 1 à 5).

Adapté de (Veltmaat *et al.*, 2003; Watson and Khaled, 2008).

I. La glande mammaire : modèle de développement et de tumorigenèse

Chez la souris que chez la femme la glande mammaire est un organe se formant en deux temps, d'abord lors du développement embryonnaire puis chez l'adulte lors de la puberté et de la gestation. Cet organe se forme par combinaison de deux grands mécanismes : la mise en place par morphogenèse de branchement d'un feuillet épithélial au sein du mésenchyme et la différenciation de cellules progénitrices en cellules spécialisées pour remplir une fonction bien spécifique au cours des étapes de gestation et de lactation. Ce développement complexe est finement régulé par un ensemble de mécanismes moléculaires qui, lorsqu'ils se déroulent au mauvais moment, au mauvais endroit ou avec une mauvaise amplitude, peuvent mener au cancer.

1- Les étapes de développement de la glande mammaire

Chez la souris on retrouve cinq paires de glandes mammaires le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 1).

Chez l'embryon le développement de la glande mammaire débute à 10,5 jours (E10,5) après la fécondation par la formation, le long de l'axe antéropostérieur, de deux crêtes mammaires (Figure 1). A E12,5, cinq paires de placodes se forment le long des crêtes à partir de l'ectoderme par migration et regroupement des cellules de chaque crête mammaire (Figure 1) (Veltmaat *et al.*, 2003; Watson and Khaled, 2008). De E11,5 à E18,5 le bourgeon épithélial se forme et pénètre dans le mésenchyme adjacent, alors dénommé « Fat Pad » car il est riche en adipocytes, pour former au final un petit arbre composé de quelques tubes épithéliaux qui stoppe sa croissance pour la reprendre à la puberté et chez l'adulte (Figure 2).

Cette partie du développement de la glande mammaire est indépendante des hormones. Elle est régulée par un dialogue complexe entre le feuillet épithélial et le mésenchyme environnant dont quelques événements moléculaires ont pu être caractérisés. Ainsi, l'épithélium induit la formation du mésenchyme mammaire notamment en sécrétant la protéine PTHRP qui active la sécrétion du facteur Bmp4 dans les cellules du mésenchyme. Bmp4 va ensuite activer une voie de signalisation en se fixant à son récepteur BMPRII, la

réponse cellulaire à cette voie de signalisation dans les cellules du mésenchyme est alors assurée par les facteurs de transcription Msx2 et Tbx3. Le mésenchyme lui régule la mise en place des placodes puis des bourgeons épithéliaux en sécrétant la protéine FGF10 qui interagit avec le récepteur FGFR2B dans les cellules épithéliales (Figure 2).

Chez la souris mâle le développement de la glande mammaire s'arrête définitivement à E15,5 sous l'effet des androgènes.

Chez l'adulte l'arbre épithélial se développe en deux phases majeures et distinctes :

- une phase de **morphogenèse de branchement** qui se déroule majoritairement pendant la puberté et qui permet la création et l'élongation des tubes épithéliaux formant au final un arbre épithélial complexe,
- une phase de **différenciation lobulo-alvéolaire** qui correspond à la période de formation des alvéoles de sécrétion du lait pendant la gestation.

Ces différentes étapes sont organisées par des structures nommées bourgeons terminaux (communément appelés TEB pour Terminal End Buds) qui apparaissent à l'extrémité de chaque tube épithélial et qui sont organisés de la façon suivante (Figure 3) (pour revue, Hinck and Silberstein, 2005; Lanigan *et al.*, 2007) :

- une couche interne de cellules progénitrices composant le corps du bourgeon. Ces cellules se différencient en cellules épithéliales luminales composant alors l'intérieur des tubes épithéliaux et des alvéoles de sécrétion pendant la lactation,
- les cellules progénitrices de la coiffe. Ces cellules se différencient en cellules myoépithéliales qui entourent les tubes épithéliaux et les alvéoles de sécrétion et peuvent se contracter pour la sécrétion du lait.

Sous l'influence de nombreux signaux pendant la puberté et la gestation, les cellules des bourgeons terminaux prolifèrent, migrent et se différencient pour former les tubes et alvéoles composant l'arbre épithélial et permettant la fabrication et la sécrétion des protéines du lait.

Enfin, après la période d'allaitement et le sevrage des jeunes, le tissu épithélial régresse jusqu'à retrouver sa structure initiale d'avant la gestation. Ce phénomène de régression, appelé involution, est dû à la mort par apoptose des cellules épithéliales et à une réorganisation complète de la glande mammaire (Baxter *et al.*, 2007).

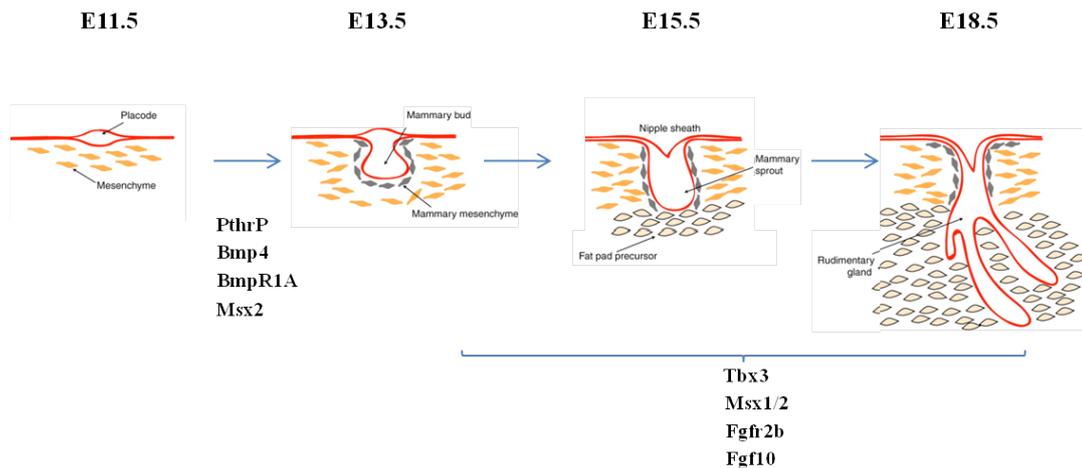


Figure 2. Les différentes phases du développement embryonnaire de la glande mammaire chez la souris et les principales voies moléculaires impliquées. A partir de E11,5 Les cellules de la placode pénètrent dans le mésenchyme pour former le bourgeon épithélial qui induit la formation du mésenchyme mammaire. Les cellules du bourgeon épithélial progressent jusqu'à former un arbre rudimentaire à E18,5. Chaque étape décrite ici est contrôlée par un jeu de molécules sécrétées par les cellules épithéliales et les cellules du mésenchyme.

Adapté de (Watson and Khaled, 2008).

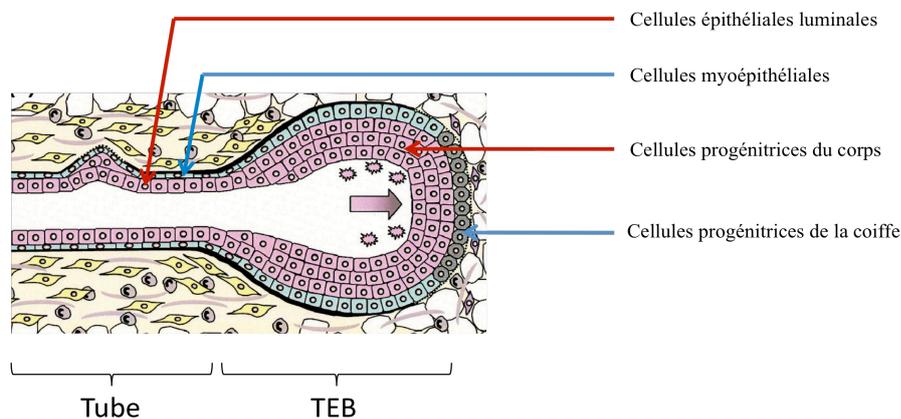


Figure 3. Organisation d'un bourgeon épithélial terminal. Le bourgeon épithélial (TEB) constitue l'extrémité du tube épithélial. La prolifération et la différenciation des cellules progénitrices permettent l'avancée du bourgeon et la progression du tube épithélial dans le mésenchyme. La flèche représente le sens de progression du TEB dans le mésenchyme environnant.

Adapté de (Lanigan *et al.*, 2007).

2- Les mécanismes moléculaires associés à la formation de la glande mammaire

Un certain nombre de molécules (facteurs de croissance, hormones, molécules de signalisation, facteurs de transcription) ont été décrits pour leur implication dans le développement de l'arbre épithélial mammaire. Parmi les principaux acteurs, les hormones jouent un rôle crucial pour le développement de la glande mammaire.

Ainsi, au cours de la puberté, la croissance et le branchement des tubes sont activés par la sécrétion ovarienne d'**œstrogènes** et par la libération au niveau de la glande pituitaire de l'**hormone de croissance (GH)**. Le facteur de croissance **IGF1** contrôle ensuite l'induction de croissance effectuée au niveau des cellules des TEBs par les œstrogènes et la GH (pour revue, (Sternlicht, 2006)).

Au cours de la gestation ce sont les **hormones placentaires**, la **progestérone** et l'hormone pituitaire **prolactine** qui induisent la différenciation alvéolaire et la sécrétion du lait (pour revue, Briskin and Rajaram, 2006).

En plus des hormones de nombreux autres mécanismes agissent sur la prolifération, la migration et la différenciation des cellules des TEB pour réguler finement la mise en place des tubes et des alvéoles.

Pendant la puberté les œstrogènes et leur récepteur **ER alpha** activent la voie de signalisation de l'**EGF** et celle de la voie **Wnt**. Les œstrogènes induisent l'expression de l'**amphiréguline (Areg)** dans les cellules épithéliales. Suite au clivage de Areg par la métalloprotéase **Adam17** le fragment libéré va stimuler le récepteur à l'EGF situé sur les cellules du stroma (Sternlicht and Sunnarborg, 2008). L'inhibition de l'un des acteurs de ce mécanisme moléculaire entraîne un arrêt de développement des tubes épithéliaux (Figure 4) (Luetkeke *et al.*, 1999; Sternlicht and Sunnarborg, 2008).

D'autres voies agissent de concert avec la voie de l'EGFR, par exemple le récepteur au FGF, **FGFR2**. La matrice extracellulaire et les molécules de dégradation de cette matrice sont aussi importantes pour le mécanisme de morphogenèse de branchement. Ainsi on observe une augmentation de l'expression des métalloprotéases **Mmp2**, **Mmp3** et **Mmp14** suite à l'activation de l'**EGFR** (Figure 4). De plus, d'autres récepteurs membranaires comme **ErbB2** et le récepteur au HGF, **Met** contrôlent aussi le phénomène de morphogenèse de branchement. Le **TGF Bêta1** quant à lui inhibe l'expression de l'**HGF**

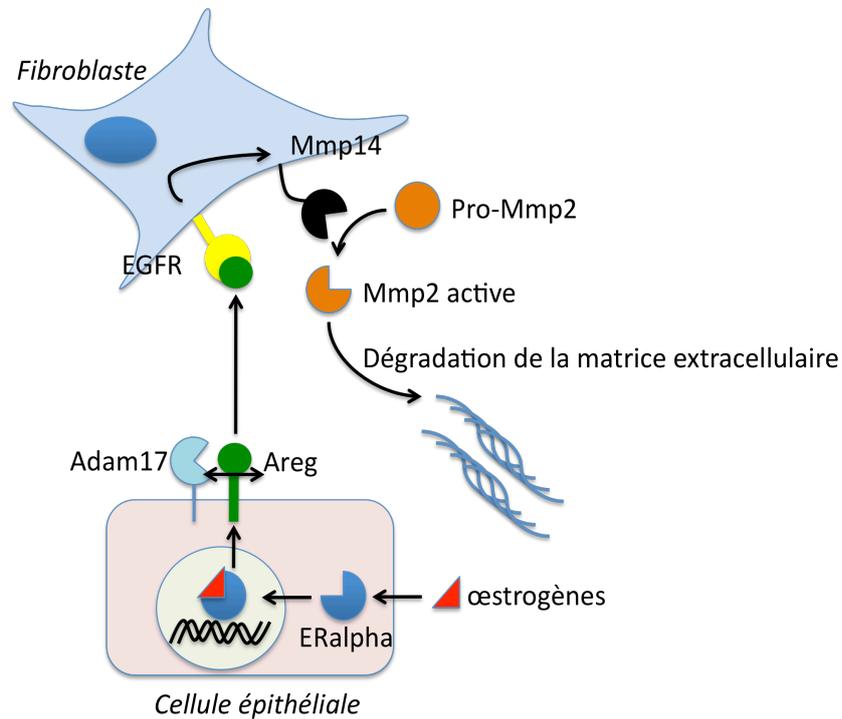


Figure 4. Représentation schématique d'un exemple de mécanisme moléculaire impliquant les œstrogènes au cours du développement de la glande mammaire pendant la puberté. Les œstrogènes sécrétés par les ovaires et leur récepteur ER alpha stimulent la production de Areg. Areg est alors clivé par la métalloprotéase Adam17 au niveau de la membrane plasmique et le fragment extracellulaire généré peut alors se fixer sur le récepteur EGFR au niveau des cellules du mésenchyme. Cette fixation permet l'activation de la voie de signalisation de l'EGFR qui stimule alors l'activité de la métalloprotéase Mmp14 nécessaire pour l'activation de la Mmp2 et la dégradation de la matrice extracellulaire.

Adapté de (Sternlicht and Sunnarborg, 2008).

dans les cellules du stroma et constitue donc un inhibiteur de la morphogenèse de branchement en limitant la prolifération des cellules épithéliales et en stimulant la synthèse des molécules de la matrice extracellulaire suite à une stimulation de la glande par les œstrogènes (Daniel *et al.*, 1996; Ewan *et al.*, 2002). Enfin, le facteur de transcription **Gata3** induit et maintient la différenciation des cellules épithéliales luminales en bloquant la progression du cycle cellulaire par l'activation de la protéine **p18^(INK4c)**, protéine inhibitrice des kinases CDK4 et 6 (Asselin-Labat *et al.*, 2007; Kouros-Mehr *et al.*, 2006; Pei *et al.*, 2009). D'autre part, les molécules **Slit2**, **Robo1**, **Netrin1** et **Neogenin**, bien décrites pour leur rôle dans le contrôle de la guidance des axones des neurones, permettent le maintien de l'intégrité des cellules progénitrices de la coiffe et l'adhérence entre les cellules épithéliales luminales et myoépithéliales (Srinivasan *et al.*, 2003; Strickland *et al.*, 2006). L'action concertée de ces différentes voies activatrices ou inhibitrices permet de réguler de façon précise l'établissement de l'arbre épithélial.

Pendant la gestation on observe l'activation de voies impliquées dans le contrôle de la balance prolifération-différenciation des cellules progénitrices composant les TEB. La voie **Jak2/Stat5a et b** est d'une grande importance. Elle est activée par la prolactine et la progestérone dans les cellules épithéliales et permet la production de **RankL** qui active alors le récepteur membranaire **RANK** et la voie **NFkB** via la kinase **IKKalpha** pour induire l'expression de la protéine du cycle cellulaire, **Cycline D1**, indispensable pour la prolifération des cellules alvéolaires même si cet effet semble indépendant de sa fonction de régulation du cycle cellulaire (Landis *et al.*, 2006; Zwijsen *et al.*, 1997). Les protéines de la famille des récepteurs à l'EGF, ErbB2, **ErbB4** et EGFR sont aussi importantes pendant la formation des alvéoles de sécrétion et la différenciation des cellules alvéolaires en activant la voie **Jak/Stat**. Enfin les molécules d'adhérence comme la **Bêta-1-Intégrine** ou encore la **E-Cadherine** entretiennent l'intégrité des cellules épithéliales entre elles et sont des molécules majeures dans la formation des alvéoles de sécrétion pendant la gestation (Boussadia *et al.*, 2002; Nemade *et al.*, 2004).

3- Les mécanismes du cancer du sein

a. Les mécanismes généraux du cancer

Lors de la transition d'un état physiologiquement normal à un état transformé les cellules acquièrent de nouvelles compétences qui peuvent être classées en six catégories (Figure 5) (Hanahan and Weinberg, 2000):

- 1- **Une indépendance aux signaux de croissance.** La prolifération des cellules est finement régulée par l'apport extérieur de facteurs de croissance qui sont synthétisés par divers types cellulaires. Les cellules cancéreuses sont capables de proliférer sans cet apport de facteurs de croissance. Pour cela, elles peuvent produire elle-même les facteurs nécessaires pour assurer leur croissance, on parle alors de régulation autocrine. On observe aussi régulièrement des mutations activatrices ou la surexpression de molécules contrôlant les voies de signalisations induites par ces facteurs de croissance.
- 2- **Une perte de sensibilité aux signaux antiprolifératifs.** La prolifération des cellules au sein des organes est contrebalancée par des signaux antiprolifératifs qui empêchent l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Les protéines comme les Cyclines D et la protéine RB régulent la progression de la phase G1 du cycle cellulaire et dictent à la cellule son entrée ou sa sortie du cycle cellulaire. L'altération de voies impliquant ces protéines est fréquemment observée dans de nombreux cancers.
- 3- **Un échappement à l'apoptose.** L'apoptose est la mort cellulaire programmée. De nombreux signaux ordonnent à la cellule de « s'autodétruire ». Ces signaux peuvent être déclenchés lorsque la cellule est en état de stress comme lors de la surexpression d'un oncogène. Les cellules cancéreuses possèdent souvent des altérations des voies de signalisation induisant l'apoptose.
- 4- **L'acquisition d'un potentiel répliatif illimité.** A chaque cycle de division les extrémités des chromosomes nommées télomères se raccourcissent jusqu'à une taille critique qui induit des voies de signalisation entraînant la mort des cellules. Ce phénomène de mort est appelé sénescence. Dans tous les types cellulaires cancéreux, les télomères sont maintenus. Dans 85% à 90% des cas, cela est dû à

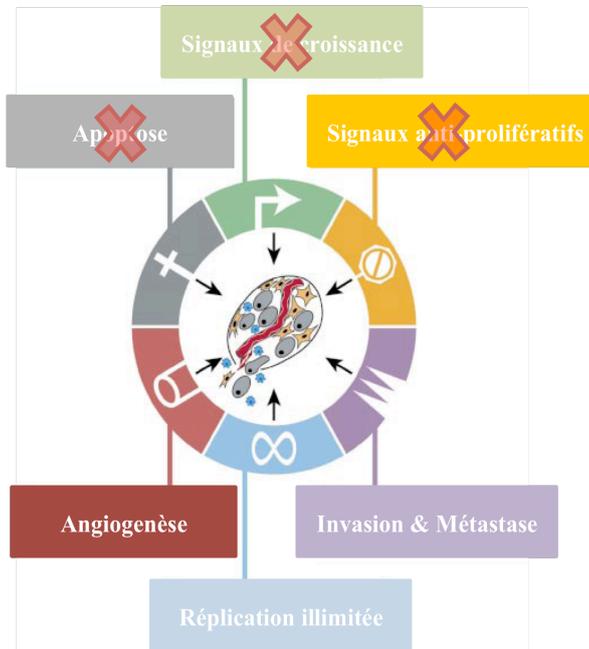


Figure 5. Digramme représentant les compétences acquises par les cellules cancéreuses pour la formation d'une tumeur et des métastases. Six catégories caractérisent les compétences acquises : indépendance aux signaux de croissance, perte de sensibilité aux signaux antiprolifératifs, échappement à l'apoptose, acquisition d'un potentiel réplcatif illimité et capacité à induire une conversion angiogénique.
D'après (Hanahan and Weinberg, 2000)

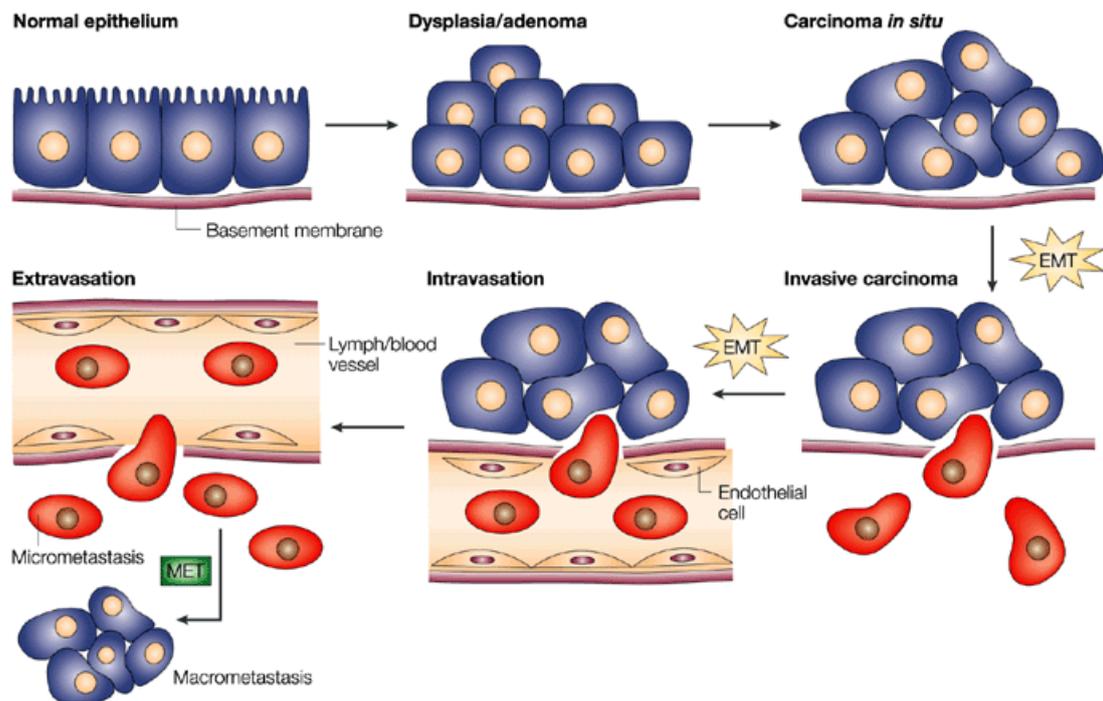
une enzyme appelée télomérase. L'expression du gène *htert* codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase humaine est fréquemment observée dans les cancers.

- 5- La capacité à induire une conversion angiogénique.** La croissance des tumeurs, l'invasion, comme la formation des métastases sont dépendantes de l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour nourrir la tumeur. L'angiogenèse requiert la stimulation des cellules endothéliales. Les cellules tumorales contrôlent l'angiogenèse en sécrétant des molécules ayant le pouvoir de:
- inhiber ou activer directement les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins,
 - recruter des cellules de l'immunité telles que les macrophages et mastocytes qui sécrètent à leur tour des facteurs angiogéniques,
 - dégrader la matrice extracellulaire ce qui entraîne le relargage de molécules angiogéniques.

- 6- L'acquisition d'un potentiel invasif et métastatique.** Les cellules épithéliales tumorales se transdifférencient en cellules de types fibroblastiques du mésenchyme, c'est la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

b. La transition épithélium-mésenchyme

La transition épithélio-mésenchymateuse se définit par la transdifférenciation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses. Ce phénomène est crucial lors de la formation de nombreux organes comme la glande mammaire puisque les cellules mésenchymateuses formées ont des capacités migratoires et invasives supérieures et peuvent alors participer à la mise en place des différents tissus. Pendant le développement ce phénomène de TEM est réversible, les cellules épithéliales ayant subi une TEM se redifférencient en cellules épithéliales pour remplir leur fonction au sein de l'organe formé, elle subissent alors un phénomène de transition mésenchyme-épithélium (TME) (pour revue, (Thiery, 2002)). C'est le cas notamment lors de la formation de l'arbre épithélial mammaire (Micalizzi *et al.*).



Nature Reviews | Cancer

Figure 6. Evolution d'une tumeur vers la métastase, implication du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Les cellules épithéliales prolifèrent de façon plus importante pour donner un adénome. Les altérations génétiques et épigénétiques vont amener à un carcinome *in situ*, toujours limité au dessus de la membrane basale. D'autres altérations vont induire une dissémination des cellules carcinomiales, parmi lesquelles la transition épithélio-mésenchymateuse. La TEM confère aux cellules cancéreuses des capacités de migration et d'invasion accrues leur permettant de dégrader la lame basale et d'envahir les tissus environnants. Puis les cellules vont passer dans le sang, par extravasation, remonter le long des vaisseaux et alors extravaser pour envahir le nouvel espace. TEM = transition épithélio-mésenchymateuse. MET = transition mésenchyme-épithélium.

D'après (Thiery, 2002).

Pendant la tumorigenèse des tissus épithéliaux (carcinomes) ce phénomène est récapitulé, les cellules épithéliales cancéreuses se transdifférencient et deviennent invasives et motiles. La TEM permet la conversion du carcinome *in situ* en carcinome métastatique et invasif. Les cellules cancéreuses peuvent alors envahir les tissus environnant migrer et s'installer dans de nouveaux organes pour former de nouvelles tumeurs (Figures 6 et 7) (pour revue, (Peinado *et al.*, 2007; Thiery, 2002). Au niveau moléculaire la TEM se caractérise par la perte de l'expression de marqueurs épithéliaux dont le mieux caractérisé et la protéine E-Cadherine et l'augmentation de l'expression de molécules plus spécifiquement exprimées dans les cellules du mésenchyme comme la Vimentine ou encore la Fibronectine (Micalizzi *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires régulant le phénomène de TEM impliquent de nombreuses voies de signalisation comme les voies HGF/Met, FGF/FGFR, TGF Beta, TGFBR ou encore les voies Wnt et Cripto1 (Fuxe *et al.*, 2010; Micalizzi *et al.*, 2010; Peinado *et al.*, 2007; Zavadil and Bottinger, 2005). De nombreux facteurs de transcription ont aussi été décrits pour induire la transition d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux, c'est le cas des protéines Snail, ou Twist ou encore Zeb. Ces facteurs de transcription régulent négativement l'expression du gène de la E-Cadhérine *cdh1* ce qui a pour conséquence une baisse de l'adhérence cellule-cellule, une perte de la polarité des cellules épithéliales et une augmentation des capacité de migration et d'invasion (Micalizzi *et al.*, 2010; Peinado *et al.*, 2007). Les cellules ayant entrepris une TEM expriment aussi de nombreuses molécules de dégradation de la matrice extracellulaire, comme les MMPs, et possèdent alors la capacité d'envahir les tissus et organes distants (Micalizzi *et al.*, 2010).

c. Le cancer du sein

Le cancer du sein est caractérisé par la présence d'une tumeur cancéreuse qui se forme à partir des cellules épithéliales de l'organe et porte donc le nom de carcinome. En fonction du stade de développement de la maladie on distingue alors deux types de carcinomes (Figure 8):

- les **carcinomes *in situ*** : *canalaire* (CCIS) si le développement malin se fait à partir des cellules luminales des tubes ou *lobulaire* (CLIS) si le développement malin se fait à partir des cellules épithéliales des alvéoles sécrétrices. Dans tous les cas, les membranes basales restent intactes,

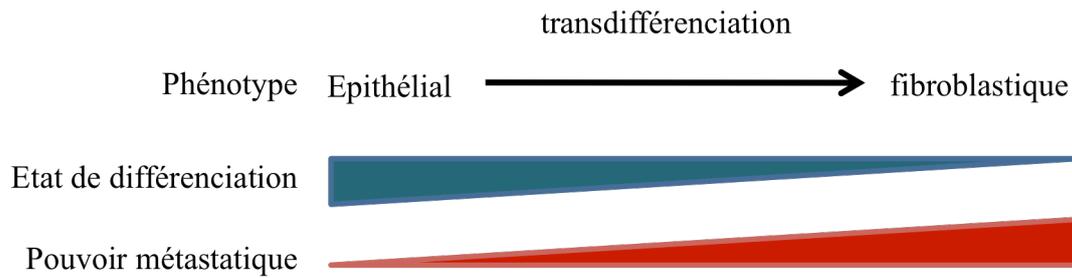


Figure 7. Schéma représentant la relation entre état de différenciation et pouvoir métastatique des cellules cancéreuses du sein. La transition épithélio-mésenchymateuse correspond à la progression du phénotype épithélial vers un phénotype fibroblastique grâce à un mécanisme de transdifférenciation. L'état de différenciation est inversement corrélé au pouvoir métastatique des cellules. Ainsi plus une cellule acquiert un phénotype fibroblastique plus elle possède un pouvoir métastatique élevé.
Adapté de (McSherry *et al.*, 2007).

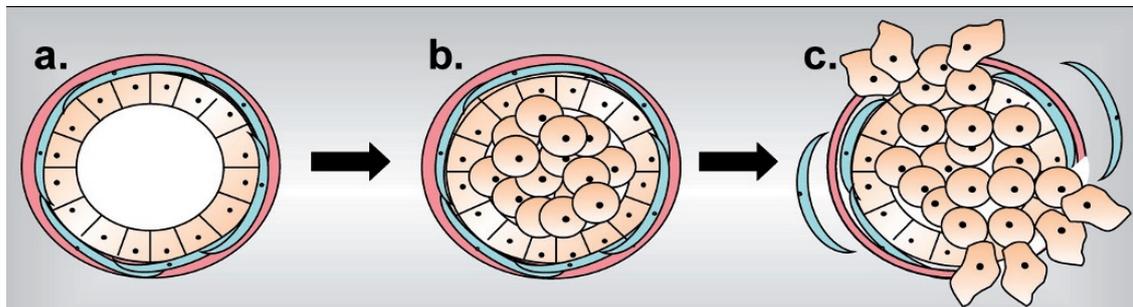


Figure 8. Représentation schématique des stades de développement du carcinome du sein. A. Coupe transversale d'un tube épithélial de glande mammaire illustrant la couche de cellules épithéliales luminales (beige) et la couche de cellules myoépithéliales (bleue) recouvertes par la lame basale (rose). B. Carcinome *in situ* canalaire (CCIS) ou lobulaire (CLIS) : les cellules prolifèrent de façon anarchique au sein du tube ou du lobule. C. Coupe transversale d'un cancer infiltrant : les cellules cancéreuses traversent la membrane basale pouvant ainsi former de nouvelles tumeurs à distance.
Adapté de (McSherry *et al.*, 2007).

- les **carcinomes infiltrants** : ce sont des cancers envahissant le tissu mammaire après dégradation de la membrane basale, évoluant localement puis essaimant pour former des tumeurs secondaires (le premier relais est constitué par les ganglions axillaires). Ces carcinomes sont le plus souvent canaux (75%), mais peuvent aussi être lobulaires (4 à 11%).

4- Les mécanismes moléculaires impliqués lors de la cancérisation de la glande mammaire

Le cancer du sein est une maladie très complexe et les mécanismes moléculaires impliqués sont très nombreux. Cependant, il est maintenant acquis que les molécules régulant le phénomène de morphogenèse de branchement ou la mise en place des alvéoles de sécrétion pendant le développement de la glande jouent aussi un rôle important pendant le développement d'une tumeur et /ou sa progression vers une forme plus agressive (pour revue, Lanigan *et al.*, 2007). L'analyse des profils d'expression dans les tumeurs et métastases combinées aux études menées dans les modèles murins ont permis de cerner un grand nombre de mécanismes clefs. Les mieux décrits (ou les plus étudiés) sont repris ci-dessous.

Le système hormonal comprenant la progestérone, les androgènes et leurs récepteurs nucléaires respectifs **ERalpha** et **PRA** et **B** joue un rôle majeur dans la pathologie (pour revue, Conzen, 2008). Ainsi, 70% des tumeurs du sein expriment le récepteur ERalpha qui constitue une cible majeure pour différentes molécules pharmacologiques comme le TAMOXIFEN[®]. ERalpha régule l'expression de nombreux gènes dont ceux codant les récepteurs à la progestérone PRA et PRB et la combinaison des deux voies induit un effet synergique sur l'établissement d'hyperplasies de la glande mammaire. Cette étude menée par Yang et collaborateurs montre donc le dialogue entre la voie de signalisation des œstrogènes et celle de la progestérone lors de l'établissement des tumeurs mammaires (Yang *et al.*, 2010).

La Cycline D1 est aussi une molécule importante qui constitue le lien entre la voie de signalisation des œstrogènes et la progression du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses humaines ainsi que lors de l'acquisition pour ces cellules d'une résistance au TAMOXIFEN[®] (Kilker and Planas-Silva, 2006; Yang *et al.*, 2010). L'importance de la Cycline D1 lors de la tumorigenèse mammaire a aussi été évaluée par l'utilisation de souris transgéniques dans lesquelles son expression est inhibée par recombinaison homologue.

Par cette technique, Xing et collaborateurs ont montré que la présence de la Cycline D1 est absolument nécessaire pour l'induction de tumeurs de la glande mammaire par les oncogènes **ErbB2** ou **Ras** alors que la tumorigenèse induite par **Wnt-1** ou **c-Myc** n'est pas affectée, possiblement à cause d'un phénomène de compensation par les **Cycline D2** et **D3** (Yu *et al.*, 2001).

De nombreux Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) sont aussi des acteurs majeurs de la tumorigenèse mammaire. C'est le cas des membres de la famille des récepteurs à l'**EGF**, **EGFR (ERBB1)** ou **ErbB2**. Ainsi ErbB2 est surexprimé dans 20 à 30% des cancers du sein et cette surexpression est inversement corrélée à la survie des patientes (Slamon *et al.*, 1987). La voie moléculaire impliquant l'EGFR, son ligand **Areg** et la métalloprotéase **Adam17**, impliquée pendant le développement de l'arbre épithélial à la puberté, est aussi nécessaire pour la croissance et la survie de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses comme les cellules à fort pouvoir métastatique MDA-MB231. L'expression d'Adam17 semble être associée à une diminution du taux de survie des patientes atteintes de cancer du sein et des molécules pharmaceutiques ciblant l'activité d'Adam17 pourraient ainsi être utilisées à des fins thérapeutiques (Kenny *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2009).

L'Adam17 n'est pas la seule métalloprotéase impliquée dans la progression du cancer du sein. En effet les cellules cancéreuses mammaires déploient un arsenal de protéines pouvant dégrader les molécules constituant la matrice extracellulaire. C'est le cas des **MMP2**, **7**, **9**, **13** ou encore **14** qui favorisent la croissance de la tumeur mais aussi l'échappement des cellules métastatiques et leur établissement dans d'autres organes (pour revue, McSherry *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*).

Enfin, différents facteurs de transcription contrôlent l'expression du génome en intégrant les signaux transmis par les voies de signalisation dérégulées pendant le cancer du sein (pour revue, Lanigan *et al.*, 2007)). Ces facteurs de transcription semblent notamment jouer un rôle très important dans le contrôle de l'état de différenciation des cellules épithéliales mammaires (pour revue, Siegel and Muller, 2010). C'est le cas par exemple des facteurs de transcription Gata3, Stat5A ou encore le facteur de transcription de la famille ETS, Elf5. L'état de différenciation des cellules cancéreuses mammaires est directement lié au pouvoir métastatique de celles-ci (Figure 7). Récemment, Meni et collaborateurs ont montré que l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse dans

des cellules épithéliales mammaires leur conférerait des propriétés de cellules non différenciées de type cellules souches (Mani *et al.*, 2008).

Cette présentation non exhaustive des principaux mécanismes moléculaires décrits pour la tumorigenèse mammaire permet d'apprécier toute la complexité des événements contrôlant la dérive de la glande mammaire vers le processus tumoral. Il apparaît aussi que la compréhension des molécules impliquées dans la mise en place de la glande permet de mieux extrapoler les connaissances sur le cancer du sein et ainsi de pouvoir envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II. Les Facteurs de transcription PEA3 de la famille ETS

1- La famille ETS

Le fondateur de la famille des gènes *ets* a été défini sur la base de son identité de séquence avec l'oncogène *v-ets* transduit par le rétrovirus aviaire E26 (Leprince *et al.*, 1983). De nombreux homologues ont ensuite été décrits dans divers modèles aussi bien invertébrés (Hart *et al.*, 2000; Hsu and Schulz, 2000) que vertébrés, dont environ 30 membres identifiés chez les mammifères (25 chez l'homme, 26 chez la souris) (Hsu and Schulz, 2000). Les gènes de cette famille encodent des facteurs de transcription qui fixent l'ADN par leur domaine de liaison à l'ADN, nommé le domaine ETS (Karim *et al.*, 1990). Ce domaine, constitué d'environ 85 acides aminés, reconnaît une séquence consensus minimale : GGAA/T, appelée EBS (ETS Binding Site) (Karim *et al.*, 1990; Nye *et al.*, 1992). En fonction du degré de conservation au niveau de ce domaine et de la similarité au niveau de la structure de ces facteurs de transcription, treize groupes ont été décrits : ETS, ELF, ERG, GABP, ELK, SPI, PEA3, PDEF, YAN, ER71, ERF, ESE et TEL (Figure 9) (Laudet *et al.*, 1999). La plupart de ces facteurs présentent leur domaine ETS en position carboxy-terminale excepté pour les membres des groupes ELK et ERF et le facteur FEV. En plus de ce domaine, les groupes ETS, ERG, ELG et TEL possèdent un domaine 'Pointed' dans la région amino-terminale, qui forme une structure hélice-boucle-hélice importante pour les interactions protéines-protéines (Kim *et al.*, 2001). Un autre domaine conservé entre plusieurs des membres de la famille ETS est le domaine dit 'acide', le plus fréquemment observé dans la région amino-terminale. Ce domaine correspond à un domaine de transactivation.

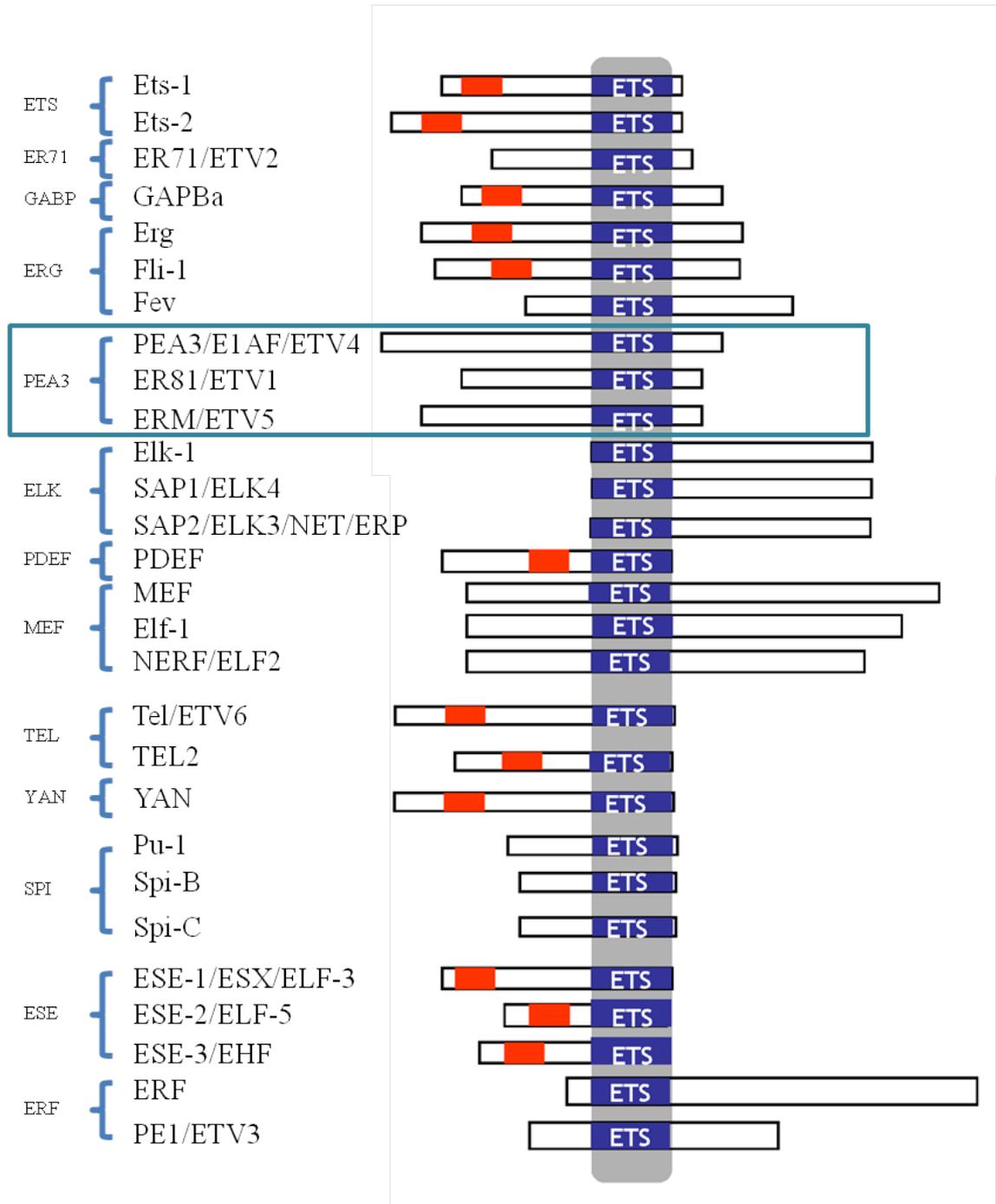


Figure 9. Représentation schématique des différents facteurs de transcription de la famille ETS. Les protéines sont classées en 13 groupes constituant la famille ETS, parmi lesquels le groupe PEA3 (encadré), et sont alignées selon la position de leur domaine de liaison à l'ADN, le domaine ETS. Le domaine Pointed présent chez certains membres est représenté en rouge.

Adapté de (Laudet *et al.*, 1999).

Les facteurs ETS sont en général décrits comme de faibles régulateurs transcriptionnels, essentiellement activateurs de la transcription. Leur activité est modulée par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, sumoylation et ubiquitination) et ils agissent souvent en partenariat avec d'autres protéines. Les facteurs ETS sont ainsi capables de contrôler l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus biologiques participant à la vie cellulaire normale mais aussi à la cancérisation (Figure 10). Le patron d'expression des facteurs ETS est très différent selon les membres et est résumé pour les principaux dans le tableau 1 (pour revue, Oikawa and Yamada, 2003).

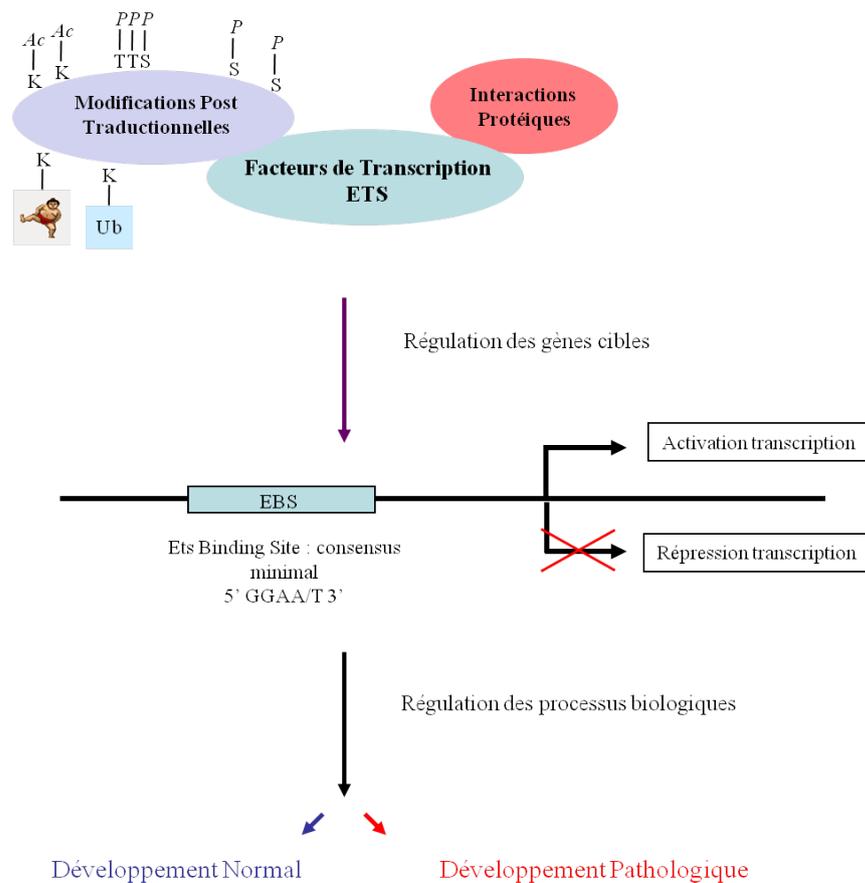


Figure 10. Représentation schématique du mode d'action des protéines de la famille ETS. Les facteurs de transcription de la famille ETS régulent l'expression de gènes cibles en se fixant à l'ADN au niveau de séquences consensus EBS (ETS Binding Site). Leur activité est régulée par un ensemble de modifications post traductionnelles et d'interactions avec des partenaires protéiques. L'ensemble de ces événements permet au final aux membres de la famille ETS de réguler des processus biologiques lors du développement normal ou pathologique.

Nom	Expression tissulaire
Ets1	Organes lymphoïdes, cerveau, cellules endothéliales
Ets2	Ubiquitaire
Erg	Cellules endothéliales, cellules hématopoïétiques, rein, tractus urinaire
Fli-1	Cellules hématopoïétiques, cellules endothéliales
GABPα	Ubiquitaire
TEL	Ubiquitaire
Elf-1	Cellules hématopoïétiques, foie, rein, intestin...
ESX	Cellules épithéliales
PU-1	Cellules B, macrophages, neutrophiles
TCF	(Elk-1, Sap, Net) Ubiquitaire
Er81/Erm	Ubiquitaire
Pea3	Glande mammaire, cerveau, épидидyme
PDEF	Prostate, glande mammaire

Tableau 1. Expression tissulaire des principaux membres de la famille ETS. D'après (Oikawa and Yamada, 2003).

2- Le groupe PEA3

Au sein de la famille ETS, le groupe PEA3 se compose de trois membres : Pea3 aussi nommé E1af ou Etv4 (Higashino *et al.*, 1993; Xin *et al.*, 1992), Er81 ou Etv1 (Brown and McKnight, 1992; Jeon *et al.*, 1995; Monte *et al.*, 1995; Roussigne and Blader, 2006), Erm ou Etv5 (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Monte *et al.*, 1994), qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN (domaine ETS) conservé à 95%. Ces trois gènes ont été mis en évidence chez l'homme, la souris, le rat, le poisson zèbre, le xénope, le chimpanzé, le macaque, le coq, le taureau et le chien. Hormis ce domaine, ces trois protéines se caractérisent par deux autres régions fortement conservées, impliquées dans la régulation de la transactivation et/ou dans l'autoinhibition de la liaison à l'ADN (Brown *et al.*, 1998; Laget *et al.*, 1996). La première correspond à une région amino-terminale de 32 acides aminés, riche en acides aminés acides, conservée à plus de 80% entre les trois membres du groupe PEA3 et dénommée 'domaine acide'. La seconde région recouvre les soixante derniers acides aminés et présente plus de 50% d'identité de séquence entre les trois facteurs. En plus de ces domaines conservés, d'autres domaines de régulation négative ont été mis en évidence pour les protéines PEA3 : deux domaines inhibiteurs de la liaison à l'ADN de part et

d'autre du domaine ETS et deux domaines inhibiteurs de la transactivation situés de part et d'autre du domaine de transactivation (illustré pour le facteur Pea3 dans la Figure 11) (Bojovic and Hassell, 2001; Degerny *et al.*, 2008; Greenall *et al.*, 2001). L'analyse phylogénétique indique que les membres Erm et Er81 sont très proches alors que la séquence du facteur Pea3 est légèrement plus divergente (de Launoit *et al.*, 1997). Chez l'homme et la souris, les gènes *erm*, *er81* et *pea3* sont constitués de 13 à 14 exons s'étendant sur environ 15kb d'ADN génomique (Coutte *et al.*, 1999; Monte *et al.*, 1995; Monte *et al.*, 1996). Dans le génome humain, *erm/etv5* est situé sur le chromosome 3 à la position 3q27-29, *pea3/elaf/etv4* sur le chromosome 17 à la position 17q21, et *er81/etv1* sur le chromosome 7 à la position 7p21. Dans le génome murin, *erm* est situé sur le chromosome 16, *pea3* sur le chromosome 11 et *er81* sur le chromosome 12.

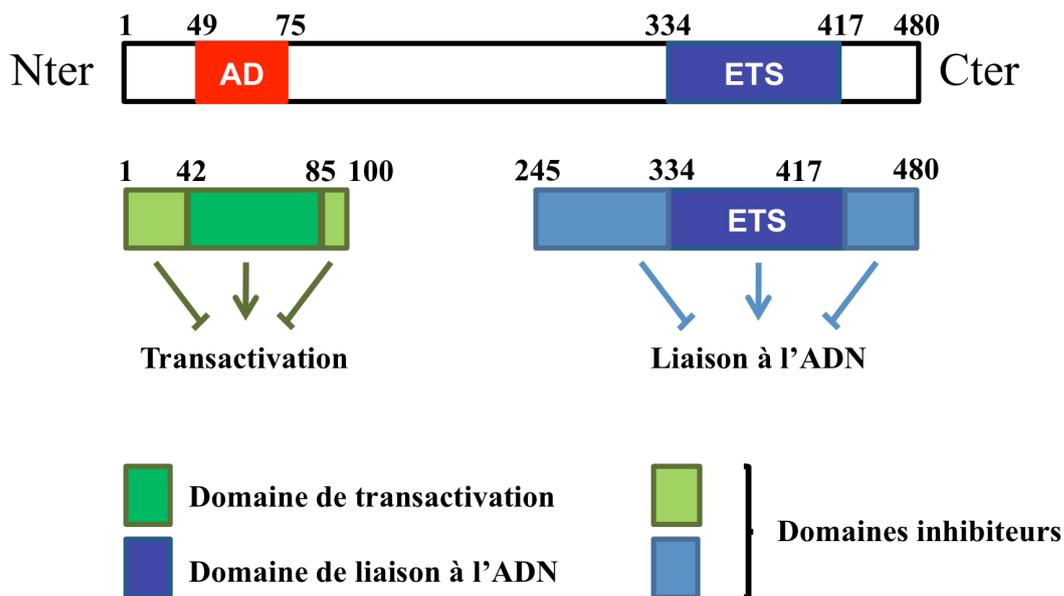


Figure 11. Schéma représentant les domaines régulateurs de la protéine Pea3. Les domaines de part et d'autre du domaine de transactivation (TD) régulent négativement la transactivation liée au facteur Pea3. Les domaines de part et d'autre du domaine de liaison à l'ADN ETS sont des domaines inhibiteurs de la liaison à l'ADN. Le domaine en position carboxy-terminale -terminale (Cter) est aussi impliqué dans la transactivation. AD : domaine 'acide'.

Adapté de (Bojovic and Hassell, 2001).

III. L'expression des facteurs de transcription du groupe PEA3

Chez la souris, la localisation des transcrits des gènes *pea3*, *erm* et *er81* a été étudiée par la technique d'hybridation *in situ* au cours des différentes étapes du développement embryonnaire. Ces études révèlent que ces trois gènes sont exprimés à tous les stades du développement embryonnaire, depuis E6,5 où les **inductions embryonnaires** se mettent en place, puis au cours de **l'organogenèse** et jusqu'après la naissance (Figure 12) (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Chotteau-Lelievre *et al.*, 2001; Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

Dans les stades précoces, le gène *erm* est exprimé à partir de E6,5 dans la portion distale de l'oeuf au niveau de l'ectoderme, alors que l'expression de *pea3* apparaît à partir de E7,5 dans la partie postérieure de l'embryon. Ces deux facteurs présentent un patron d'expression qui se recouvre en partie à tous les stades embryonnaires précoces. Au contraire, les transcrits de *er81* ne sont pas détectés avant E9,0-9,5 (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2001).

A travers les différents stades du **développement embryonnaire**, ils sont fortement exprimés au niveau de nombreux organes mettant en jeu des interactions entre le compartiment épithélial et le mésenchyme adjacent, comme le cerveau, les reins, les poumons ou le cœur ainsi que lors de la mise en place du système nerveux (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997) (pour exemple, Figure 13).

Au niveau du **système nerveux**, l'expression du facteur Pea3 comme celle du facteur Er81 définit l'identité de groupes de neurones sensoriels du ganglion de la racine dorsale et de motoneurones dans les régions branchiales et lombaires de la colonne latérale motrice du tube neural Figure 14A (Lin *et al.*, 1998). Erm quand à lui est exprimé dans les cellules neurales des racines ganglionnaires dorsales, du ganglion sensoriel crânial et du ganglion sympathique Figure 14B (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Hagedorn *et al.*, 2000). Plus tard, il a été montré que les trois membres sont retrouvés dans les fibres intrafusales des muscles pendant les stades précoces du développement du membre et persistent après la naissance (Arber *et al.*, 2000; Hippenmeyer *et al.*, 2002) et dans la zone ventriculaire du néocortex dès le milieu de l'embryogenèse (Hasegawa *et al.*, 2004). Les gènes *er81* et *pea3* sont exprimés dans les récepteurs sensoriels de la peau appelés corpuscules de Pacini (Sedy *et al.*, 2006), *er81* dans les cellules de Schwann (Parkinson *et al.*, 2002) et dans les

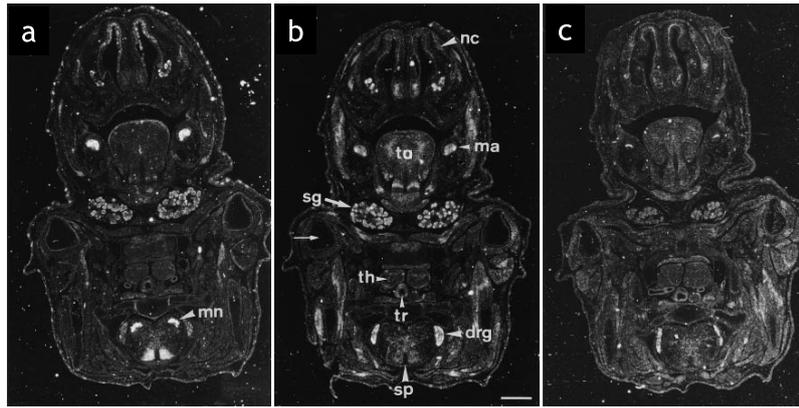


Figure 12. Illustration du patron d'expression de *pea3* (a), *erm* (b) et *er81* (c) sur des coupes transversales d'embryons de souris de 15,5 jours par hybridation *in situ*. *pea3*, *erm* et *er81* sont exprimés au niveau de nombreux organes comme le cerveau, les reins, les poumons, le cœur (non présents sur ces coupes), les glandes salivaires (sg), le tissu neural incluant la moelle épinière (sp) et les motoneurons dans lesquels l'expression de *pea3* est très importante (mn), les dents (ébauche de molaire, ma), etc...drg, ganglions de la racine dorsale; ma, ébauche de molaire; nc, cavité nasale; sg, glande salivaire; sp, colonne vertébrale; th, thymus; tr, trachée; to, langue; mn, motoneurons; squelette cartilagineux (flèche). Echelle : 550 μm.

D'après (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997).

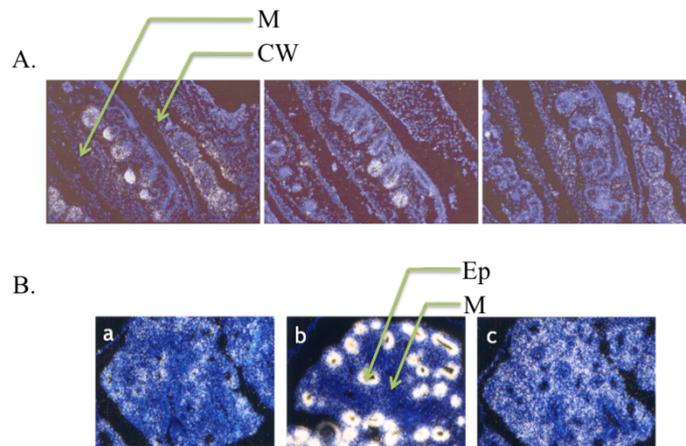


Figure 13. Observation de l'expression de *pea3* (a), *erm*(b) et *er81* (c) dans des embryons de souris de 9,5 (A) et 15,5 (B) jours par hybridation *in situ*. A. Coupes transversales d'embryon de 9,5 jours au niveau du métanéphros. *pea3* et *erm* sont exprimés à l'extrémité des canaux épithéliaux du canal collecteur de Wolff; l'expression de *er81* est située au niveau du mésenchyme. B. Coupes transversales de poumon d'embryon de 15,5 jours. L'expression de *pea3* et d'*erm* est située au niveau de l'épithélium des bourgeons terminaux en cours de progression dans le mésenchyme pulmonaire; l'expression de *er81* est située au niveau du mésenchyme.

D'après (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997) (A) et (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003) (B).

neurones pyramidaux de la couche V du cortex ainsi que dans le thalamus (Figure 14C). (Yoneshima *et al.*, 2006).

Les trois membres du groupe PEA3 présentent un patron d'expression spécifique et assez récurrent, associé aux organes se mettant en place par **morphogenèse de branchement**. Ce type d'organogenèse fait intervenir des interactions entre le compartiment épithélial et le mésenchyme adjacent de manière à permettre à un compartiment épithélial de progresser dans un compartiment mésenchymateux en formant une arborescence, comme c'est le cas pour le poumon, le rein mais aussi la glande mammaire (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Chotteau-Lelievre *et al.*, 2001).

Le modèle général d'expression de ces trois gènes lors de la morphogenèse de branchement est le suivant : les gènes *pea3* et *erm* sont généralement exprimés au niveau du feuillet épithélial dans les bourgeons épithéliaux (TEB) où le branchement s'opère, et le gène *er81* au niveau du mésenchyme entourant ces bourgeons (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Chotteau-Lelievre *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2009).

Le modèle de la **glande mammaire** est celui pour lequel nous disposons de plus d'informations. Ainsi, l'expression des trois gènes est observée à tous les stades du développement de la glande, dès la mise en place du bourgeon épithélial des cinq paires et jusqu'à l'évolution post-natale.

A l'état embryonnaire, les gènes *pea3*, *erm* et *er81* sont fortement exprimés à E15,5 au niveau du bourgeon épithélial (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Kurpios *et al.*, 2009). Lors des différents stades de développement post-natal, l'expression de *pea3* et *erm* est détectée spécifiquement au cours de la puberté et de la gestation, et ceci uniquement au niveau des tubules épithéliaux en cours de formation alors qu'aucun signal n'a pu être détecté au cours de la lactation ou de l'involution (Figure 15. A.) (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude réalisée en utilisant des souris dans lesquelles l'expression du gène *lacZ* est sous le contrôle du promoteur d'un des deux allèles des gènes *pea3*, *erm* ou *er81* endogènes, a permis d'affiner la localisation de l'expression transcriptionnelle de ces facteurs de transcription. Il apparaît dans cette étude que *pea3* et *erm* sont exprimés dans les cellules progénitrices de la coiffe des TEB ainsi que dans les cellules myoépithéliales, alors que *er81* est exprimé dans les cellules épithéliales lumineuses des tubes épithéliaux (Kurpios *et al.*, 2009) (Figure 15B).

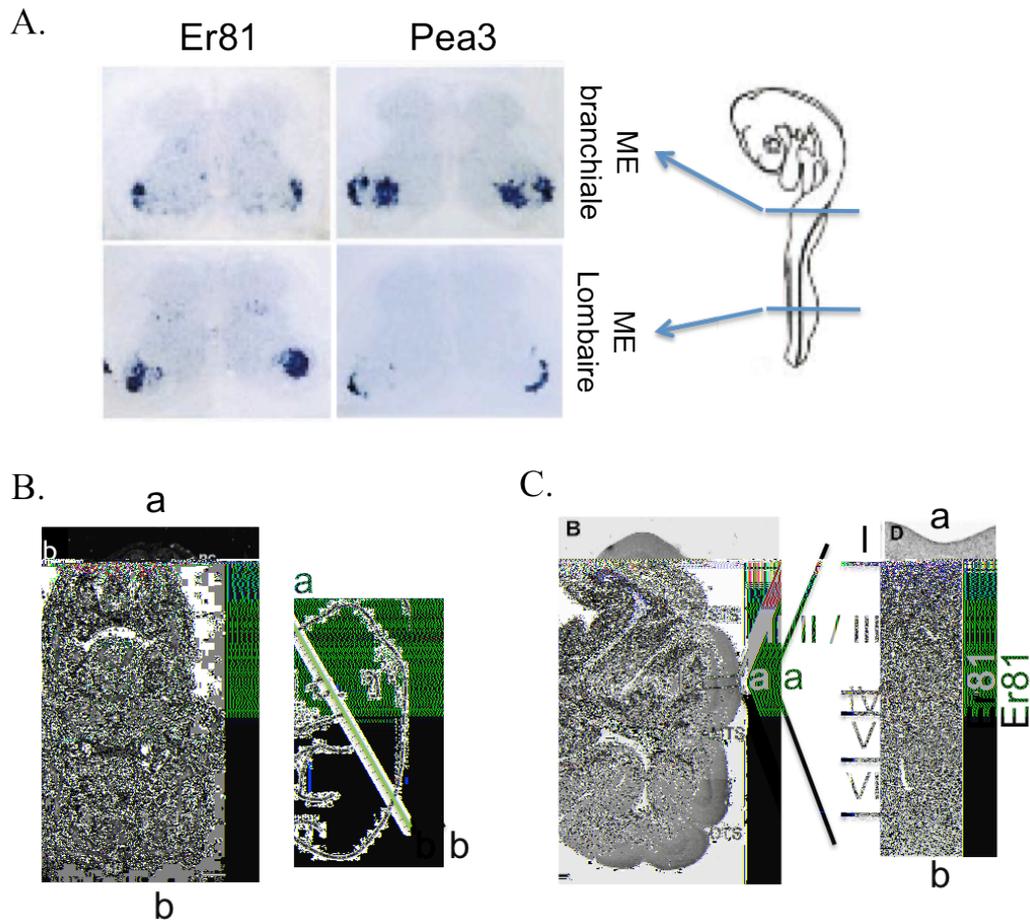


Figure 14. Expression des membres du groupe PEA3 au cours du développement du système nerveux. A. Coupes transversales de la moelle épinière d'un embryon de poulet au stade de développement 35. Pea3 et Er81 sont exprimés dans les motoneurones de la moelle épinière au niveau branchiale et lombaire.

Adapté de (Lin *et al.*, 1998).

B. Coupe transversale d'un embryon de souris à 15,5 jours et expression de *erm* au niveau des racines ganglionnaires dorsales (DRG).

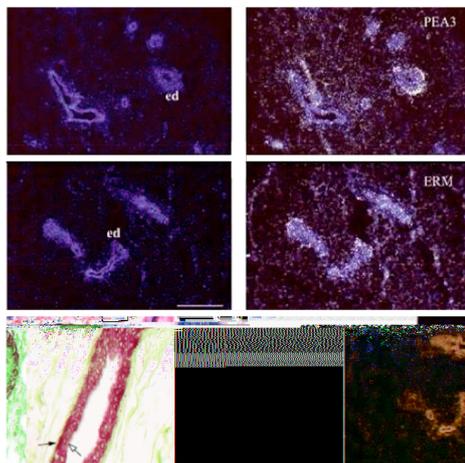
Adapté de (Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997).

C. Coupe transversale du cortex cérébral de rat 7 jours après la naissance. Le marquage de *er81* par hybridation *in situ* indique son expression spécifique dans la couche V du cortex cérébral.

Adapté de (Yoneshima *et al.*, 2006).

Chez l'adulte, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les gènes *erm* et *er81* présentent une expression ubiquiste mais avec une expression plus marquée dans le testicule, le cerveau, le poumon et le côlon, tandis que les ARNm de *pea3* sont uniquement détectés au niveau du testicule, du cerveau, de la glande pituitaire, du placenta et de la glande mammaire (Brown and McKnight, 1992; Chotteau-Lelievre *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2006; Jeon *et al.*, 1995; Monte *et al.*, 1994; Monte *et al.*, 1995; Xin *et al.*, 1992).

A.



B.

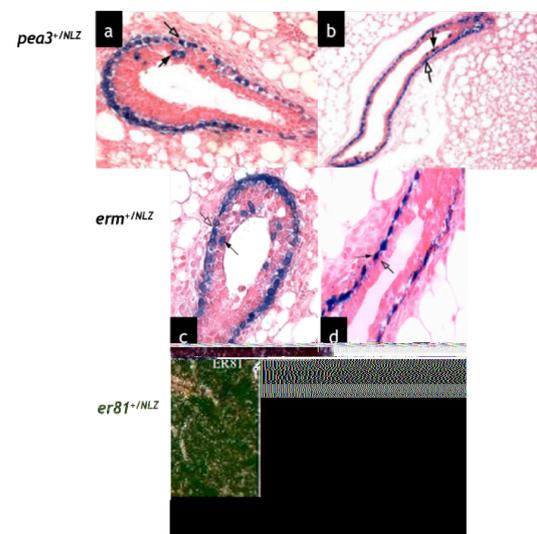


Figure 15. Expression des membres du groupe PEA3 lors de la mise en place de la glande mammaire. A. Expression de *pea3*, *erm* et *er81* par hybridation *in situ* au stade pubertaire de 26 jours post-natal. *pea3* et *erm* sont exprimés au niveau des tubules épithéliaux alors que l'expression de *er81* n'a pas pu être détectée dans cette étude (ed). Barre : 200µm.

D'après (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

B. Expression de *pea3*, *er81* et *erm* dans des souris *pea3*^{+NLZ}, *erm*^{+NLZ} et *er81*^{+NLZ} respectivement, représentée par la visualisation de la coloration liée à l'expression de la Bêta-Galactosidase. La flèche creuse indique l'expression dans les 'cap cells' des TEB pour a, c et e. La flèche pleine indique l'expression dans les 'body cells' pour a, c et e. La flèche creuse indique l'expression dans les cellules myoépithéliales pour b, d et f. La flèche pleine indique l'expression dans les cellules épithéliales luminales pour b, d et f.

D'après (Kurpios *et al.*, 2009).

IV. Etude de la fonction des facteurs de transcription du groupe PEA3 au cours du développement

Jusqu'à relativement récemment, à part la fonction d'activateurs (majoritairement) ou répresseurs de la transcription, peu de rôles avaient pu être définis pour ces molécules. Depuis, les patrons d'expression des membres du groupe PEA3 lors du développement ont pu être complétés par la mise en place de modèles murins d'inhibition de leur expression et/ou de leur fonction. Ces modèles ont permis de mettre en évidence que les facteurs Pea3, Erm et/ou Er81 (en fonction des études) sont cruciaux pour la mise en place ou le développement de certains organes, tissus ou fonction physiologique. Il a ainsi été démontré que Pea3, Erm et/ou Er81 participent à la formation des membres antérieurs, sont importants pour la spermatogenèse, la mise en place du système nerveux et pour la formation des poumons, reins ou glande mammaire, organes mis en place lors du développement embryonnaire par morphogenèse de branchement.

1- Pea3, Erm et la formation des membres antérieurs

Deux études basées sur l'utilisation de techniques différentes ont montré l'importance de Pea3 et Erm dans le contrôle de la formation des membres antérieurs chez la souris. En effet, sous le contrôle de la voie FGF, Pea3 et Erm régulent négativement l'expression de la protéine Sonic Hedgehog (SHH) dans la partie antérieure du mésenchyme du bourgeon de membre. Ainsi l'utilisation d'un dominant négatif des membres du groupe PEA3 ou l'inactivation de Pea3 et Erm par recombinaison homologue chez la souris entraîne une perte de polarisation lors de la formation du membre antérieur et l'apparition d'un phénotype de type polydactyle (Mao *et al.*, 2009; Zhang *et al.*).

2- Le facteur Erm et la spermatogenèse

Différentes études ont montré l'importance d'Erm pour la prolifération et donc l'auto-renouvellement des cellules souches germinales dans le testicule de souris. Tout d'abord des travaux menés sur des souris *erm*^{-/-} indiquent que celles-ci sont viables mais que les mâles sont stériles. Cette stérilité est due à un problème de sécrétion des cellules de Sertoli qui entretiennent le renouvellement des cellules souches germinales. On observe alors une perte des cellules souches germinales après la première vague de spermatogenèse Figure 16 (Chen *et al.*, 2005). Même si les mécanismes moléculaires impliqués et le rôle précis

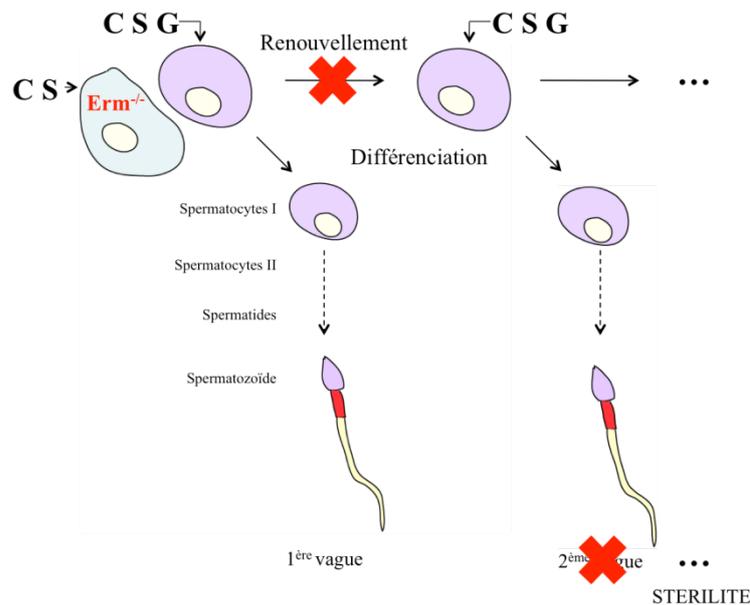


Figure 16. Représentation schématique de la fonction du facteur de transcription *Erm* lors de la spermatogenèse. La spermatogenèse est assurée par les cellules souches germinales (CSG) qui subissent une série d'étapes de différenciation aboutissant à la formation des spermatozoïdes. Dans le même temps les cellules souches germinales ont la capacité de s'autorenouveler afin d'entretenir un stock de cellules souches disponibles pour les étapes de différenciations. *Erm* est exprimé dans les cellules de Sertoli (CS) entourant les cellules souches germinales. La délétion d'*erm* dans les souris *erm*^{-/-} entraîne un défaut de renouvellement des cellules souche germinales dont le stock s'épuise alors dès la première vague de spermatogenèse ne pouvant plus assurer les vagues de différenciation suivantes. Il en résulte donc des souris mâles stériles.

Adapté de (Chen *et al.*, 2005).

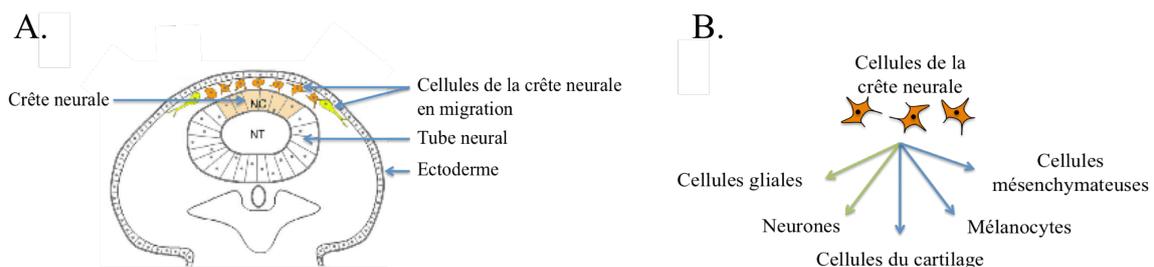


Figure 17. Représentation schématique de la migration et du devenir des cellules de la crête neurale lors du développement embryonnaire. A. Les cellules des crêtes neurales se détachent du tube neural et migrent à travers l'embryon pour former divers types cellulaires. B. Une fois atteint leur destination au sein de l'embryon les cellules se différencient et génèrent alors divers types cellulaires. L'expérience de Paratore et collaborateurs indiquent que le facteur *Erm* intervient lors de cette étape de différenciation notamment pour la formation des cellules neuronales et gliales (flèches vertes).

Adapté de (Kulesa *et al.*, 2010; Paratore *et al.*, 2002).

du facteur Erm ne sont pas encore élucidés il semblerait que dans les cellules de Sertoli, le facteur Erm soit responsable de la production de certains facteurs comme la chemokine SDF1 (CXCL12) suite au traitement de cellules de Sertoli par le FGF2 (Yoon *et al.*, 2009). Enfin, plus récemment, il a été décrit que Erm est aussi important pour le développement des cellules souches germinales du testicule. En effet il est directement exprimé dans ces cellules suite à leur stimulation par le GDNF et l'activation des voies PI3K/AKT et SKF. Cette régulation de l'expression serait importante pour le maintien et le renouvellement des cellules souches germinales *in vitro* (Oatley *et al.*, 2007). De plus, l'implantation de cellules souches germinales n'exprimant plus Erm dans le testicule de souris dépourvu de cellules souches germinales ne permet pas de reproduire une spermatogenèse normale soulignant donc bien le rôle de Erm pour le maintien de ces cellules (Morrow *et al.*, 2007).

3- Les membres du groupe PEA3 et la mise en place du système nerveux

Au cours du développement du cortex, dans les précurseurs des neurones corticaux, l'expression spatio-temporelle de Pea3, Erm et Er81 est régulée par le FGF18 et son récepteur FGFR3. Il a aussi été montré que des souris transgéniques exprimant une protéine dominant négatif de Pea3, Erm, Er81 ou du FGFR3 présentent des défauts similaires de positionnement des neurones corticaux. Ces résultats indiquent donc que la voie de signalisation FGF18-FGFR3 sollicite les membres du groupe PEA3 pour la migration de cette population neuronale (Hasegawa *et al.*, 2004).

Le facteur Erm lui, semble important pour la mise en place de la crête neurale, tissu embryonnaire qui subit une TEM et dont les cellules migrent vers de nombreux endroits du corps où elles se différencient en un grand nombre de structures, dont des neurones ganglionnaires. L'utilisation d'un dominant négatif de ce facteur dans les cellules de la crête neurale réduit leur différenciation en neurones et stimule leur différenciation en cellules de la glie. Néanmoins, le facteur Erm est aussi requis pour la prolifération des cellules de la glie sans que cela n'affecte leur destinée (Figure 17) (Paratore *et al.*, 2002). Dans un autre contexte, il a été montré que, dans les cellules musculaires, le facteur Erm régule l'expression de gènes au niveau des synapses avec les axones des motoneurones. Une inhibition de son expression chez la souris induit une perte d'expression de ces gènes associée à des faiblesses musculaires similaires à celles observées chez les personnes atteintes du syndrome myasthénique congénital (Hippenmeyer *et al.*, 2007).

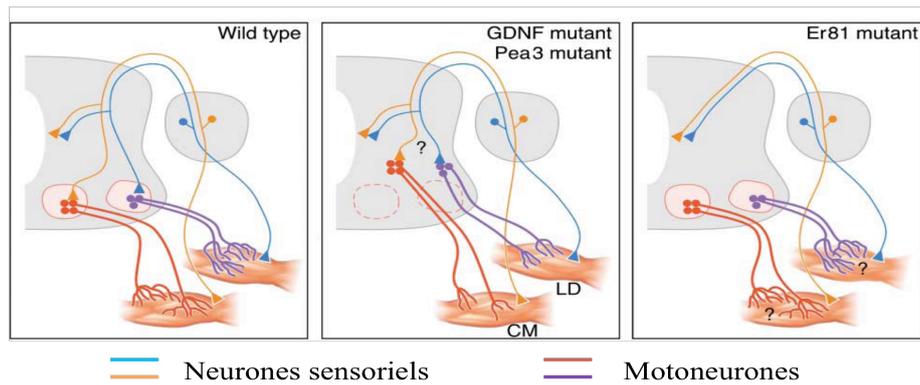


Figure 18. Représentation de l'implication des facteurs de transcription Pea3 et Er81 lors de la mise en place des motoneurones et neurones sensoriels. Chez les souris sauvages les neurones sensoriels innervent les muscles et transmettent l'information aux motoneurones présents dans la moelle épinière qui envoient alors un signal aux cellules musculaires cibles. L'inhibition de Pea3 (Pea3 mutant) ou du GDNF (GDNF mutant) entraîne un défaut de positionnement des corps cellulaires de motoneurones dans la moelle épinière et des défauts de projection des axones dans les muscles cibles. Une répression de l'expression de Er81 (Er81 mutant) entraîne un défaut de projection des axones de neurones sensoriels et une perte de connexion entre ces neurones et les motoneurones. LD (lactissimus dorsi) et CM (cutaneous maximus) : muscles cibles innervés. Adapté de (Koo and Pfaff, 2002).

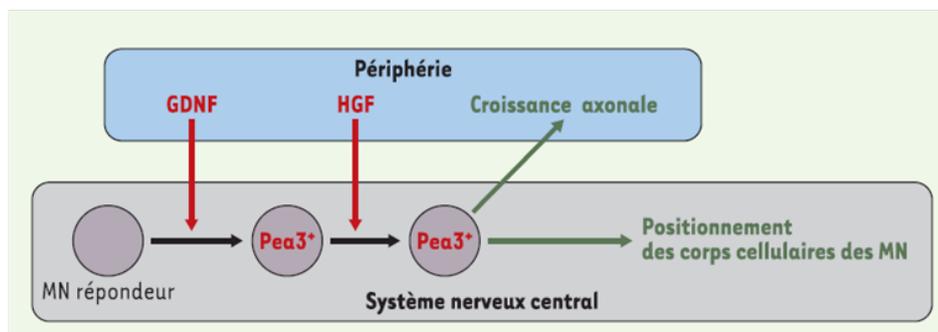


Figure 19. Représentation schématique du dialogue s'établissant entre Pea3 et les voies du GDNF et du HGF lors de la mise en place des motoneurones. La stimulation des motoneurones par le GDNF induit l'expression de Pea3 puis la stimulation par le HGF permet le positionnement des corps cellulaires et la croissance des axones des motoneurones exprimant Pea3. D'après (Chauvet *et al.*, 2004).

Concernant Pea3, l'équipe de John Hassell a pu mettre en évidence que son invalidation par recombinaison homologue entraîne un problème de stérilité chez les souris mâles, et que la stérilité provenait d'un problème d'éjaculation qui pourrait être d'origine nerveuse, même si aucune preuve n'a encore pu être amenée (Laing *et al.*, 2000). Il est maintenant bien établi que Pea3 et Er81 participent de façon complémentaire à la mise en place d'un réseau complexe de neurones sensoriels et de motoneurones permettant le mouvement des muscles des membres chez la souris. L'analyse de la fonction de Pea3 et Er81 a ainsi été étudiée à partir de souris dans lesquelles leur expression est réprimée par recombinaison homologue (*pea3*^{-/-} et *er81*^{-/-}).

De ces études il ressort que le facteur Pea3 contrôle l'arborisation terminale et le positionnement final des corps cellulaires des motoneurones. La perte de fonction du facteur Pea3 dans des souris *pea3*^{-/-} résulte en une perte dramatique de l'arborisation et de l'innervation des muscles cibles des motoneurones exprimant en temps normal *pea3*. Ce défaut est visible tant dans les phases précoces embryonnaires que post-natales. Les corps cellulaires des motoneurones sont eux déplacés de leur positionnement caractéristique dans la colonne motrice latérale (Figure 18) (Ladle and Frank, 2002; Livet *et al.*, 2002). Par contre, l'absence du facteur Pea3 n'a pas d'influence sur les neurones sensoriels ou sur les connexions interneuronales (Ladle and Frank, 2002).

Plusieurs études ont été menées pour comprendre les voies de signalisation impliquant Pea3 dans le contrôle des événements décrits précédemment. Ainsi, dans un mutant nul pour le GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor), l'expression du facteur Pea3 est absente dans la plupart des motoneurones et cela conduit au même phénotype que celui décrit dans les mutants *pea3*^{-/-} (Haase *et al.*, 2002). De la même manière, une mutation inhibitrice du récepteur Met, empêchant sa signalisation, donne un phénotype ressemblant à ceux des souris *gdnf*^{-/-} ou *pea3*^{-/-} et l'on observe une diminution de l'expression de *pea3* d'environ 60% au niveau des motoneurones. Il est intéressant de noter que l'expression du facteur Pea3 est requise pour l'expression du récepteur Met à ce niveau. Le GDNF induit l'expression de *pea3* dans les motoneurones en position caudale puis ces motoneurones, sous l'influence de l'HGF, induisent l'expression de *pea3* dans les motoneurones en position rostrale (Figure 19) (Helmbacher *et al.*, 2003). GDNF et HGF sont donc des facteurs sécrétés en périphérie qui contrôlent dans certains motoneurones l'expression du facteur Pea3 qui à son tour, contrôle l'expression des gènes responsables de la position des corps cellulaires ainsi que du trajet des axones. Enfin, dans un mutant de délétion *radlh2*^{-/-}

de la rétinaldéhyde deshydrogénase, une enzyme de la voie de synthèse de l'acide rétinoïque, les neurones exprimant *pea3* sont mal positionnés dans la colonne motrice latérale, cependant le mécanisme impliqué n'est toujours pas clair (Vermot *et al.*, 2005).

Le facteur Er81 est impliqué dans la régulation de la formation des connections synaptiques entre les neurones afférents sensoriels Ia et les motoneurones. En l'absence d'expression de Er81, les souris sont viables à la naissance pendant 3 à 5 semaines mais présentent une ataxie des membres et une mauvaise posture de flexion/extension. Les axones des neurones sensoriels proprioceptifs sont incapables de faire une arborisation à proximité des dendrites des neurones moteurs, se terminant prématurément au niveau dorsal dans la moelle épinière (Figure 18) (Arber *et al.*, 2000). Il semblerait que l'expression d'Er81 dans les neurones sensoriels contrôle le moment de leur différenciation terminale. Une perte d'expression ou une expression précoce dans le temps entraîne un défaut de différenciation menant à un défaut de croissance des neurites et axones et ayant pour conséquence une perte de la capacité de ces neurones à former des connexions avec les motoneurones (Hippenmeyer *et al.*, 2005). Il est important de noter que le phénotype observé dans le système nerveux des souris *er81*^{-/-} peut être complété par un défaut de différenciation des cellules du fuseau neuromusculaire normalement innervées par les neurones sensoriels exprimant Er81 ainsi que par une diminution du nombre d'organes tendineux de Golgi qui sont des mécanorécepteurs (Arber *et al.*, 2000; Kucera *et al.*, 2002).

Tout comme pour *Pea3*, différentes voies de signalisation régulant et étant régulées par le facteur de transcription Er81 au cours du développement du système nerveux ont pu être mises en évidence.

Ainsi des souris dans lesquelles l'expression des gènes codant la Neurotrophine 3 et la protéine pro-apoptotique Bax est inhibée par recombinaison homologe (souris *bax*^{-/-}/*nt3*^{-/-}) présentent le même défaut de projection des axones des neurones sensoriels proprioceptifs que les souris *er81*^{-/-}. De plus l'expression du facteur Er81 est en parallèle diminuée dans ces neurones sensoriels et la stimulation de cette population neuronale par l'ajout de Neurotrophine 3 induit l'expression de Er81 (Patel *et al.*, 2003).

4- Les facteurs du groupe PEA3 et la morphogénèse de branchement

a. *Erm* et la formation des poumons

Au niveau du poumon, l'expression d'un transgène codant une protéine dominant négatif de Erm, EngR-*erm*, entraîne un blocage de développement des poumons, aussi bien lors du phénomène de morphogénèse de branchement que lors de la différenciation des cellules précurseurs. En effet, la différenciation se fait bien au niveau des cellules proximales pour donner les cellules ciliées et les cellules de Clara. Par contre, la différenciation des cellules distales en alvéoles matures de type I ou II n'a pas lieu (Eckel *et al.*, 2003).

b. *Pea3*, *Erm* et la formation des reins

Concernant le développement des reins, des travaux récents ont permis de montrer l'importance des facteurs Pea3 et Erm en tant que régulateurs de l'activité de la voie activée par le GDNF et son récepteur Ret. Ainsi, des explants de bourgeons de rein stimulés par le GDNF présentent une expression plus importante de Pea3 et Erm (Aaltonen *et al.*, 2009). Cette régulation est cruciale puisque des souris dans lesquelles l'expression de Pea3 et Erm est tout ou partie inhibée par une technique de recombinaison homologue (*Pea3*^{-/-}; *Erm*^{+/-}) présentent un arrêt complet de développement des reins similaire à celui observé chez des souris *Ret*^{-/-}. Ce défaut de développement est dû à un arrêt du processus de morphogénèse de branchement des tubules épithéliaux où sont normalement exprimés Pea3 et Erm (Figure 20) (Kuure *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que l'activation de Pea3 et Erm par le GDNF permet l'expression de nombreux gènes cibles dont le gène *met* codant le récepteur au HGF (Lu *et al.*, 2009). Il existe donc dans un organe se mettant en place par morphogénèse de branchement comme le rein, un mécanisme de régulation similaire à celui observé lors de la mise en place des motoneurones et impliquant le GDNF, les membres du groupe PEA3 et la voie HGF/Met.

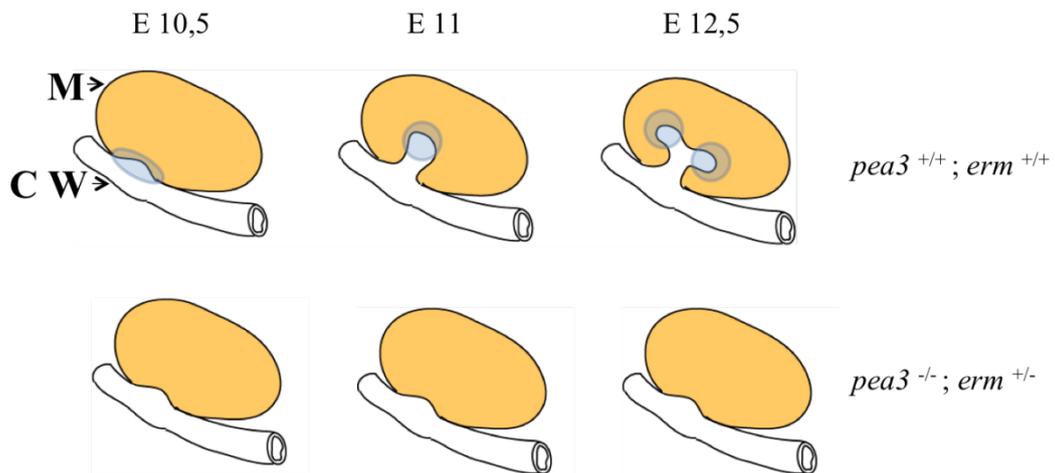


Figure 20. Représentation schématique de l'implication des facteurs Pea3 et Erm lors de la formation des reins par morphogenèse de branchement chez l'embryon de souris. Pendant le développement embryonnaire, à partir de 10,5 jours, le canal de Wolff entre dans le mésenchyme métanéphrique et se développe par morphogenèse de branchement. Les zones en bleu indiquent l'expression de Pea3 et Erm chez les souris sauvages ($Pea3^{+/+}$; $Erm^{+/+}$). L'inhibition de Pea3 et Erm ($Pea3^{-/-}$; $Erm^{-/-}$) entraîne un arrêt de la morphogenèse de branchement. M= Mésenchyme métanéphrique, CW= Canal de Wolff.

D'après (Lu *et al.*, 2009).

c. Pea3, Erm et la mise en place de l'arbre épithélial mammaire

Récemment, le rôle de Pea3 lors des différents stades de développement de la glande mammaire a été analysé en utilisant des souris *pea3^{-/-}*. Ainsi l'équipe de John Hassell a montré que l'inhibition de Pea3 entraînait une diminution du nombre d'alvéoles de sécrétion pendant la gestation et une augmentation du nombre de bourgeons épithéliaux terminaux pendant la puberté. Ce résultat indique donc potentiellement une fonction dans la différenciation lobulo-alvéolaire et une fonction qui serait ici inhibitrice du phénomène de morphogénèse de branchement pour Pea3 (Kurpios *et al.*, 2009).

Cet effet semble contredire une étude menée dans le laboratoire indiquant l'induction de capacités morphogénétiques suite à la surexpression de façon constitutive des facteurs Pea3 ou Erm dans des cellules épithéliales mammaires « normales ». En effet ces cellules épithéliales ont la capacité de former des branchements dans un gel de collagène en condition de stimulation par l'HGF. Les cellules surexprimant le facteur Pea3, comme le facteur Erm ont la capacité de faire une arborescence spontanée en gel de collagène en absence d'HGF, ce dont les cellules parentales sont incapables, arborescence équivalente à celle obtenue avec les cellules parentales cultivées en présence d'HGF. La surexpression des facteurs Pea3 et Erm, en présence d'HGF, permet d'augmenter cet effet « morphogénétique ». De plus, ces cellules acquièrent une capacité invasive en gel de collagène (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

Cependant, l'étude menée par le laboratoire de John Hassell montre aussi que l'expression de *pea3*, *erm* et *er81* est retrouvée dans les cellules progénitrices de la coiffe (Kurpios *et al.*, 2009). Ces cellules ont un fort pouvoir prolifératif, invasif et migratoire donc Pea3 pourrait être impliqué dans le contrôle de ces effets cruciaux pour la mise en place de la glande mammaire. Ces données seraient alors en accord avec l'effet de la surexpression de Pea3 sur les capacités de migration et d'invasion des cellules épithéliales entraînant des capacités morphogénétiques accrues observées dans l'équipe (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

L'augmentation de la quantité de bourgeons épithéliaux terminaux observée dans les souris *pea3^{-/-}* serait alors, selon les auteurs, probablement due au fait que Pea3 soit aussi impliqué dans le contrôle de la différenciation des cellules progénitrices pendant la puberté et la gestation. En effet, l'inhibition de Pea3 entraîne l'accumulation de cellules non

différenciées en état de prolifération, ces cellules pourraient alors participer au phénomène de morphogenèse de branchement (Figure 21) (Kurpios *et al.*, 2009).

En conclusion, les facteurs de transcription Pea3 et Erm sont importants pour la mise en place de l'arbre épithélial mammaire lors du développement chez l'adulte. Néanmoins, les mécanismes moléculaires régulés par ces facteurs dans ce contexte restent à découvrir.

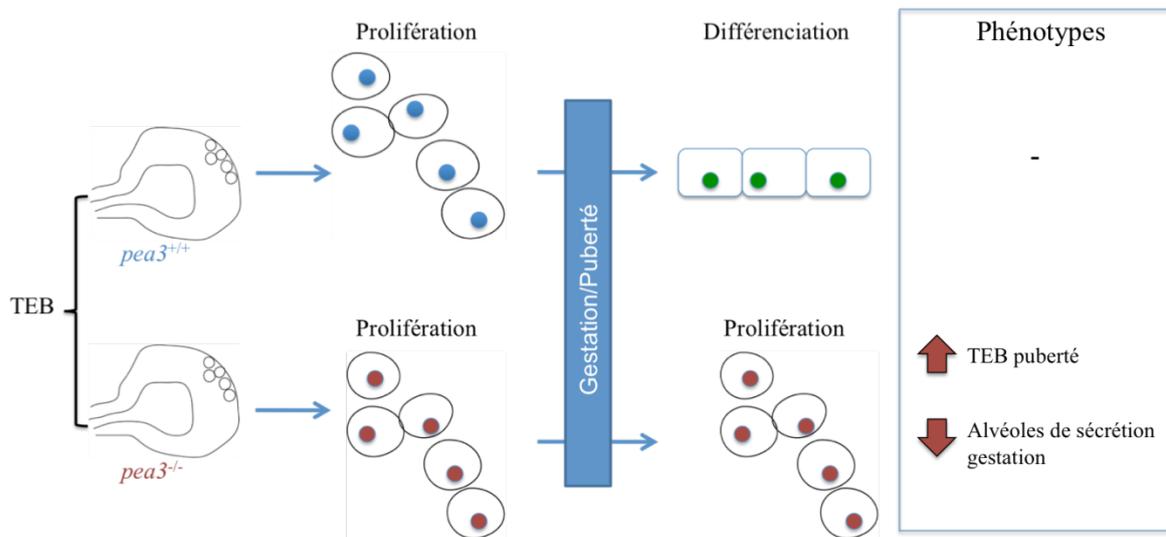


Figure 21. Représentation schématique du rôle de Pea3 lors de la différenciation des cellules progénitrices de la glande mammaire pendant la puberté et la gestation. Pea3 est fortement exprimé dans les cellules progénitrices de la coiffe des TEB et son expression devient nulle suite à leur différenciation. L'inhibition de Pea3 (*pea3^{-/-}*) par recombinaison homologue entraîne un défaut de différenciation et une accumulation de cellules en prolifération participant probablement à une augmentation du nombre de bourgeons épithéliaux terminaux (TEB) à la puberté et une diminution du nombre d'alvéoles de sécrétion pendant la gestation. D'après (Kurpios *et al.*, 2009).

V. Les membres du groupe PEA3 et le Cancer

Le cancer est la seule pathologie pour laquelle l'implication des membres du groupe PEA3 est documentée. Pea3, Erm et Er81 sont surexprimés dans un certain nombre de tissus tumoraux provenant de divers organes comme l'estomac (Yamamoto *et al.*, 2004), le côlon (Horiuchi *et al.*, 2003; Nosho *et al.*, 2005a; Nosho *et al.*, 2005b), le tractus oral (Shindoh *et al.*, 1996), l'ovaire (Davidson *et al.*, 2003; Davidson *et al.*, 2004) ou encore le cerveau (Jiang *et al.*, 2007b).

Dans quelques cas particuliers de cancers, les gènes du groupe PEA3 sont réarrangés. C'est le cas des sarcomes d'Ewing pour lesquels la translocation chromosomique de cinq gènes de la famille ETS a été observée dont *er81* (Jeon *et al.*, 1995) et *pea3* (Kaneko *et al.*, 1996; Urano *et al.*, 1996) (pour revue, (Arvand and Denny, 2001; Janknecht, 2005)). Les protéines chimériques formées présentent, par l'apport d'une partie du gène *ews*, un potentiel transactivateur accru. De même, *pea3*, *erm* et *er81* sont aussi réarrangés, dans certains cancers prostatiques, avec la région non codante du gène *TMPRSS2* (Transmembrane protease serine 2) (Helgeson *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2006; Tomlins *et al.*, 2005).

Une surexpression de ces facteurs de transcription est aussi observée lors de la cancérogenèse des organes qui se développent par morphogenèse de branchement (par exemple poumon et sein). Dans ces organes la surexpression des membres du groupe PEA3 est souvent corrélée au potentiel invasif des tumeurs et l'utilisation de modèles cellulaires a permis de montrer qu'ils pouvaient induire des capacités d'invasion et migration *in vitro* et *in vivo*.

1- PEA3 et le cancer du Poumon

L'étude de tumeurs du poumon à petites cellules (NSCLC) et de lignées cellulaires cancéreuses du poumon montre que l'expression de l'ARN messenger *pea3* est détectée dans la plupart des cas, alors que son expression n'est pas retrouvée dans le poumon normal et dans les lignées cellulaires correspondantes. De plus, la surexpression constitutive du facteur Pea3 dans des cellules cancéreuses de poumon (NSCLC) qui n'exprime pas le facteur Pea3, augmente les capacités de migration et d'invasion de ces cellules (Hiroumi *et al.*, 2001). Le facteur Pea3 va aussi pouvoir activer la voie

Rho/ROCK, et par cette voie réguler l'invasion et la migration des cellules (Hakuma *et al.*, 2005). Ces cellules surexprimant le facteur Pea3 injectées soit par voie sous-cutanée, soit en intra pulmonaire dans des souris immunodéficientes, induisent la formation de tumeurs. Dans la plupart des cas, les tumeurs sont accompagnées de métastases dans le cas des injections intra-pulmonaires (Hakuma *et al.*, 2005). Upadhyay et collaborateurs ont montré que l'inhibition de Pea3 dans des cellules cancéreuses pulmonaires entraîne une diminution de leur potentiel invasif et que la surexpression de Pea3 dans des cellules épithéliales bronchiques non transformées entraînait la perte de l'expression de marqueurs épithéliaux et l'expression de marqueurs du mésenchyme indiquant l'induction d'une transition épithélium-mésenchyme (Upadhyay *et al.*, 2006). Enfin, dans des cellules de poumon à potentiel métastatique (PGBE1), le facteur Pea3 va pouvoir activer la Beta1,4-galactosyltransférase I. Les deux protéines sont surexprimées dans ces cellules par rapport à des cellules non métastatiques comme les PGLH7 et sont impliquées dans leur potentiel invasif. De plus, la surexpression du facteur Pea3 dans les cellules PGLH7 entraîne une augmentation de la capacité de migration de ces cellules (Zhu *et al.*, 2005).

2- PEA3 et cancer du sein

Plusieurs analyses de l'expression des membres du groupe Pea3 indiquent qu'ils sont régulièrement surexprimés dans les tumeurs du sein et que cette surexpression est corrélée au stade d'évolution de la maladie. En effet même si une étude contradictoire réalisée sur des patientes japonaises a montré un taux de survie plus élevé chez celles dont les tumeurs expriment *pea3* (Kinoshita *et al.*, 2002), des études plus récentes portant sur des tumeurs humaines confirment le rôle du facteur Pea3 dans la cancérogenèse mammaire en tant que marqueur de l'agressivité tumorale (Bieche *et al.*, 2004) et de la progression tumorale en effusion maligne (Davidson *et al.*, 2004), et celui d'Erm comme valeur pronostique des cancers épithéliaux mammaires (Figure 22) (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2004).

La surexpression des membres du groupe PEA3 est aussi décrite dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires plus particulièrement dans les cellules plus agressives en terme de capacité à induire des métastases en xénotransplante dans des souris

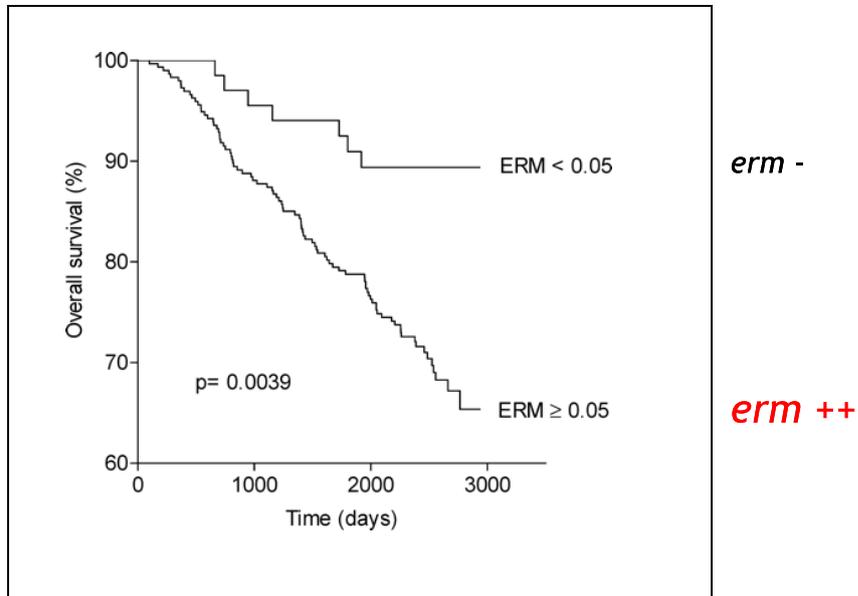


Figure 22. Corrélation entre le taux de survie et l'expression d'*erm* dans les tumeurs du sein. L'expression importante d'*erm* est associée à un faible taux de survie des patientes.

D'après (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2004).

immunodéficientes (Baert *et al.*, 1997). Ce lien avec le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses mammaires a été reporté plusieurs fois. Ainsi la surexpression ectopique de Pea3 dans des cellules cancéreuses mammaires non métastatiques MCF-7 leur confère des capacités de migration et la possibilité de former des métastases après injection dans des souris immunodéprimées, capacités associées à une augmentation de l'expression de l'enzyme de dégradation de la matrice extracellulaire Mmp9 (Figure 23) (Kaya *et al.*, 1996).

Enfin, on observe une forte relation entre ces facteurs de transcription et la formation de tumeurs induites par des oncogènes comme Wnt-1 ou encore ErbB2.

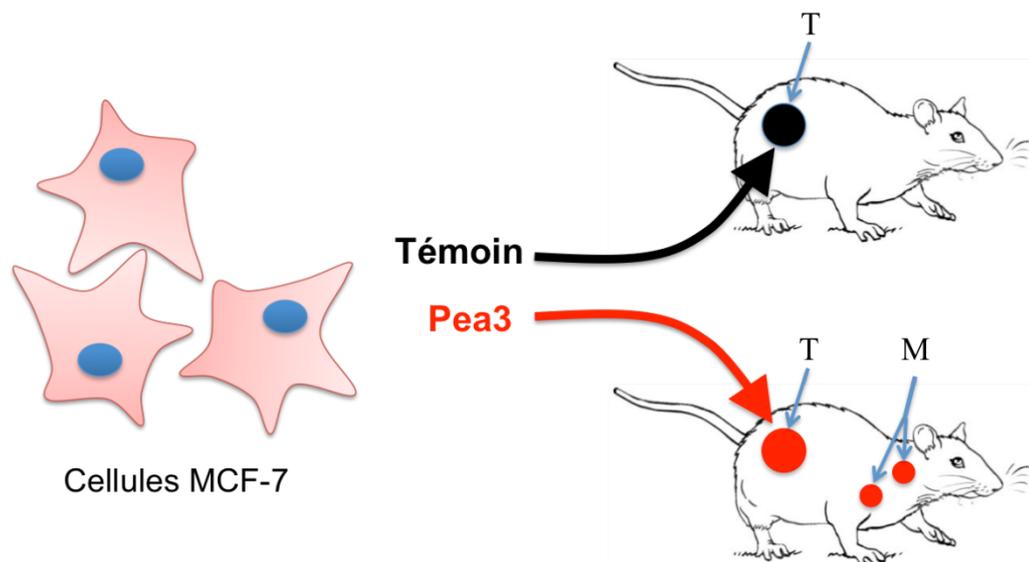


Figure 23. Représentation schématique de l'expérience de Kaya et collaborateurs. Les cellules MCF-7 injectées dans des souris immunodéprimées forment des tumeurs. L'expression ectopique de Pea3 dans ces cellules leur confère la capacité de faire des métastases. T = Tumeur, M = Métastases.

Adapté de (Kaya *et al.*, 1996).

a. PEA3 et les cancers du sein surexprimant l'oncogène Her2/Neu/ErbB2

La relation entre PEA3 et l'oncogène Her2/Neu/ ErbB2 dans le cancer du sein se fait à plusieurs niveaux. En effet différents auteurs ont décrit la surexpression de Pea3, Erm et Er81 dans des tumeurs humaines surexprimant ErbB2 et les métastases associées, tout comme dans des tumeurs murines induites par la surexpression de ErbB2 (Benz *et al.*, 1997; Bieche *et al.*, 2004; Fleming *et al.*, 2004; Galang *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2006; Shepherd *et al.*, 2001; Trimble *et al.*, 1993).

D'un point de vue fonctionnel, Il semblerait que l'activation du récepteur ErbB2 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle des membres du groupe PEA3 sur les promoteurs de différents gènes cibles comme les gènes *mmp1*, *smad7* ou *htert* (Dowdy *et al.*, 2003; Goel and Janknecht, 2004; Goueli and Janknecht, 2004; Trimble *et al.*, 1993; Vageli *et al.*, 2009). Cette activation de l'activité a aussi été observée sur les promoteurs des gènes *pea3* et *erbb2* indiquant une possible boucle de régulation positive entre Pea3 et ErbB2 (Benz *et al.*, 1997; Bosc *et al.*, 2001). Cependant, il est à noter qu'une étude menée dans des lignées tumorales mammaires et ovariennes indique que Pea3 peut réprimer l'expression de ErbB2 en diminuant l'activité de son promoteur (Xing *et al.*, 2000). Enfin, Meyers et collaborateurs ont montré que la présence de l'oncogène ErbB2 dans des cellules primaires tumorales du sein favorise l'expression de Pea3 suite à la stimulation de ces cellules par les facteurs de croissance EGF et FGF, d'autres acteurs importants de la tumorigenèse mammaire (Myers *et al.*, 2006).

Enfin, des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de ErbB2 sous le contrôle du promoteur viral MMTV (MMTV-ErbB2) développent des tumeurs mammaires d'origine épithéliale. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris exprimant un dominant négatif des membres du groupe PEA3 sous le contrôle du promoteur MMTV (MMTV-DNPEA3), le délai d'apparition des tumeurs est augmenté d'environ deux fois (Shepherd *et al.*, 2001). Ce résultat montre bien la nécessité de la présence des facteurs de transcription du groupe PEA3 pour la cancérogenèse induite par l'oncogène ErbB2 dans la glande mammaire.

b. PEA3 et les tumeurs induites par l'oncogène Wnt-1

Les données disponibles sont exclusivement basées sur l'utilisation de modèles murins. Ainsi, Pea3, Erm et Er81 sont surexprimés dans des tumeurs de la glande mammaire induites par la surexpression de l'oncogène Wnt-1 par rapport au tissu mammaire normal (Baker *et al.*, 2010; Howe *et al.*, 2001). L'implication fonctionnelle du facteur Pea3 lors de ce phénomène a été analysée selon la même stratégie que pour l'étude de l'oncogène ErbB2, c'est-à-dire en utilisant un dominant négatif des facteurs de transcription du groupe PEA3 sous le contrôle du promoteur MMTV (MMTV-DNPEA3). Cette étude indique que le dominant négatif entraîne un retard d'apparition des tumeurs. De plus, les tumeurs apparaissant chez les souris MMTV-DNPEA3 semblent perdre l'expression du dominant négatif pendant leur évolution. Tous ces résultats indiquent que les facteurs de transcription du groupe PEA3 jouent un rôle important pour la cancérisation de la glande mammaire contrôlée par l'oncogène Wnt-1 (Baker *et al.*, 2010).

VI. Les voies de signalisation impliquant les facteurs du groupe PEA3

L'ensemble des mécanismes décrits précédemment et permettant l'activation des facteurs PEA3 sont contrôlés par des voies de signalisation intracellulaire. Certaines de ces voies ont pu être décrites pour PEA3 telles que celles contrôlées par l'oncogène Ras : la voie MAP Kinases et la voie JNK / SAPK ou encore les voies PI3K/AKT (de Launoit *et al.*, 1997; Oatley *et al.*, 2007). Ces voies sont régulées par l'activation de récepteurs membranaires comme le récepteur ErbB2 ou le récepteur au GDNF, Ret, précédemment décrits dans les paragraphes IV.4.b. et V.2.a. En plus de ceux là les membres du groupe PEA3 ont aussi été reportés pour être impliqués dans la voie Wnt β -Caténine, la voie du FGF ou encore la voie de l'HGF (Figure 24).

1- La voie Wnt/ β Caténine

Plusieurs données vont dans le sens d'une implication du facteur Pea3 dans la voie de signalisation de la protéine Wnt-1. Cette voie est connue pour jouer un rôle aussi bien dans le développement que dans la tumorigenèse. Le facteur Pea3, comme les facteurs Erm et

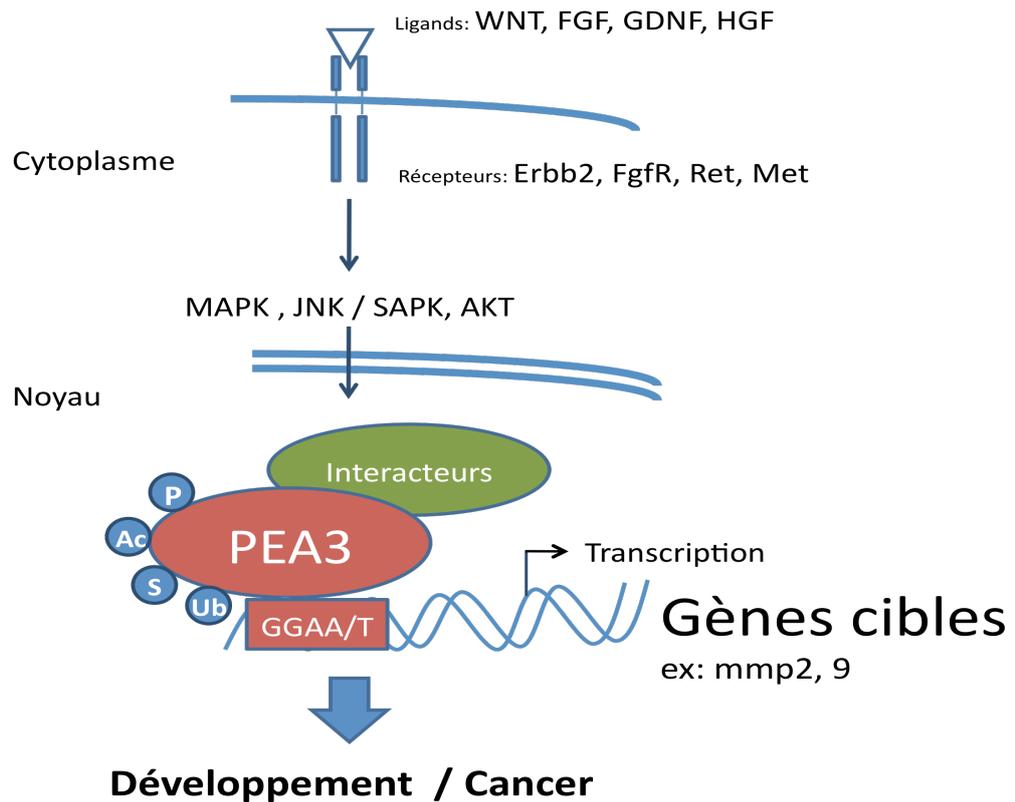


Figure 24. Représentation schématique de la relation entre les facteurs de transcription du groupe PEA3 et les voies de signalisation induites par les récepteurs membranaires et leurs ligands, des mécanismes de régulation de l'activité des membres du groupe PEA3 et de leur mode d'action. Les facteurs de transcription du groupe PEA3 intègrent les signaux envoyés par les voies de signalisation issues de l'activation des récepteurs membranaires en activant la transcription de gènes cibles. L'activité de ces facteurs de transcription est régulée par les interactions avec d'autres protéines et des modifications post-traductionnelles, P=Phosphorylation, Ac=Acétylation, S=Sumoylation, Ub= Ubiquitination. L'achèvement de ce mécanisme permet la régulation d'étapes du développement sa dérégulation est fréquemment observée lors de divers cancers comme le cancer du sein.

Er81, semblent contribuer à la régulation de gènes cibles de la voie Wnt-1/ β -caténine, comme le gène de la *matrilysine* (Crawford *et al.*, 2001), le gène *cox-2* (Howe *et al.*, 2001) ou le gène *twist* (Howe *et al.*, 2003). De plus, le facteur Pea3 est surexprimé dans les cellules C57/Wnt1, mais aussi comme les facteurs Erm et Er81 dans les tumeurs mammaires extraites de souris transgéniques surexprimant Wnt-1 (Howe *et al.*, 2001) ainsi que dans des cellules surexprimant la β -caténine (Liu *et al.*, 2004). Enfin, Pea3 est aussi capable de réguler l'expression de certains gènes de la famille WNT comme le gène *wnt5b* lors du développement des nageoires chez le poisson zèbre (Lee *et al.*, 2009).

2- La voie de signalisation du FGF

De nombreuses études indiquent la forte relation entre les membres du groupe PEA3 et la voie de signalisation FGF dans différents types d'organes et de cellules lors du développement de divers organismes modèles.

L'activité de la voie du FGF permet une régulation de l'expression des membres du groupe PEA3. C'est le cas, lors du développement de l'embryon de Xénope où l'expression de Er81 est induite par les molécules bFGF et eFGF et que l'inhibition de cette voie entraîne une diminution de son expression.

Chez le poisson zèbre l'expression de Pea3 et Erm est dépendante de l'activité de la voie FGF lors de la mise en place des somites, du système nerveux, des yeux, du cœur ou encore de l'endoderme du pharynx (Raible and Brand, 2001; Roehl and Nusslein-Volhard, 2001; Zhu and Guthrie, 2002).

Chez le poulet la transcription du facteur Pea3 lors du développement de la rétine est régulée par l'activation du récepteur au FGF et par le FGF1, en partie par la voie de signalisation des MAP Kinases (McCabe *et al.*, 2006).

Enfin, dans le poumon de souris, les facteurs Erm et Pea3 sont en aval de la voie de signalisation induite par le FGF et répondent différemment aux différents FGF. Le FGF7 et le FGF10 permettent l'expression de *erm* et *pea3* dans l'épithélium distal du poumon cultivé dans une matrice extracellulaire de type Matrigel[®], mais aussi au niveau de l'endoderme du poumon entier. Le FGF2 permet aussi une induction de l'expression des deux gènes dans l'endoderme et le mésoderme. Le FGF9 lui permet une expression dans l'épithélium proximal (Liu *et al.*, 2003).

Ainsi, le contrôle des membres du groupe PEA3 par la voie du FGF est cruciale pour la régulation de l'expression de gènes cibles spécifiques et le développement de divers organes. C'est le cas par exemple chez le poulet lors du développement du système nerveux puisque Pea3 contrôle l'expression du gène *krox20* suite à la stimulation par le FGF3 dans les rhombomères 3 et 5 (Weisinger *et al.*, 2010). De même, dans le sclérotome, Pea3 contrôle la régulation de l'expression du facteur de transcription *scleraxis* (régulateur du développement du mésoderme) par la voie de signalisation du FGF (Brent and Tabin, 2004).

Chez la souris, Erm et Pea3 sont en aval de la voie de signalisation du FGF et régulent ainsi la migration et le positionnement des neurones corticaux (Hasegawa *et al.*, 2004). Pea3 et Erm régulent aussi la morphogenèse contrôlée par les voies de signalisation FGF10/FGFR2 et Ret lors du développement du rein (Michos *et al.*).

Chez le poisson zèbre, Pea3 et Erm régulent l'expression de nombreux gènes cibles de la voie FGF lors de différents stades de développement du poisson et notamment le gène *dup6* lors de la mise en place du cœur (Znosko *et al.*, 2010). Enfin l'activation de Pea3 par la voie FGF module l'activité de la voie de signalisation Sonic Hedgehog dans la rétine en contrôlant l'expression du gène *shh* et lors du mécanisme de régénération des nageoires en contrôlant l'expression du gène *Wnt5b* (Lee *et al.*, 2009; Vinothkumar *et al.*, 2008).

3- La voie de signalisation de l'HGF

Peu de données sont disponibles quant au rôle des membres du groupe Pea3 dans la voie de signalisation induite par l'HGF et son récepteur Met. Cependant, il a été montré qu'il existe une boucle de régulation positive entre Pea3 et la voie HGF cruciale pour la progression d'un groupe de motoneurones depuis la partie caudale vers la partie rostrale de l'embryon chez la souris. Dans cette boucle Pea3 régule l'expression de Met le récepteur au HGF et le couple HGF/Met régule l'expression de Pea3 (Helmbacher *et al.*, 2003).

Des données indiquent que l'expression de *pea3* est augmentée de manière dose-dépendante par l'HGF dans un modèle cellulaire de carcinome squameux oral, cet effet étant associé à une augmentation de l'expression de différentes enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MMPs) ainsi qu'à une augmentation du potentiel invasif des cellules (Hanzawa *et al.*, 2000). Dans un modèle de cellules du poumon, l'ajout de HGF/SF entraîne une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules exprimant de manière constitutive le facteur Pea3, mais pas dans les cellules témoins.

Enfin, dans des cellules de cancer non à petites cellules Pea3 et HGF activent de façon synergique la voie Rho/ROCK, voie impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire (Hakuma *et al.*, 2005).

L'intégration de signaux extracellulaires décrits ici, par les membres du groupe PEA3, permet une régulation fine du transcriptome des cellules lors du développement ou lors de la progression des cancers.

VII. Modulation de l'activité des facteurs du groupe PEA3

Les voies de signalisation décrites précédemment agissent sur l'activité des facteurs de transcription du groupe PEA3 en régulant:

- les interactions entre les facteurs du groupe PEA3 et des partenaires protéiques au niveau des promoteurs des gènes cibles,
- les modifications post-traductionnelles (Figure 24).

1- Les interactions protéiques

Comme pour les autres protéines de la famille ETS, l'interaction avec des partenaires protéiques semble importante pour la modulation de l'activité transcriptionnelle des protéines du groupe PEA3. Il a par exemple été montré que la protéine Erm interagit avec le facteur de transcription c-Jun, ce qui a pour conséquence une augmentation importante de l'activité transcriptionnelle de la protéine Erm (Nakae *et al.*, 1995). Par ailleurs, une synergie entre le complexe AP-1 (constitué de c-Jun et c-Fos) et les membres du groupe PEA3 a également été observée sur les promoteurs des gènes *collagénase* (Gutman and Wasylyk, 1990), *matrilysine* (Crawford *et al.*, 2001), *stromélysine* (Higashino *et al.*, 1995), *cox-2* (Liu *et al.*, 2004), *ostéopontine* (El-Tanani *et al.*, 2004) et *mmp2* et *13* (Diaz-Sanjuan *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2008). Plus récemment l'interaction entre Pea3 et les protéines SRC1 ou 3 a été décrite comme cruciale pour l'activation des gènes *mmp2*, *mmp13* et *twist1* lors du processus d'invasion de tumeurs de la glande mammaire induites par l'oncogène *PyMT* (Qin *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2008). Enfin toujours dans le contexte de la progression tumorale, Pea3 interagit de façon indépendante de la présence de chromatine

avec le facteur de transcription SP1, permettant ainsi son recrutement au niveau du promoteur de ces gènes cibles (Jiang *et al.*, 2007a).

La protéine Er81 interagit avec le cofacteur de transcription CBP/p300, ce qui entraîne une synergie entre ces deux facteurs pour l'activation de la transcription des gènes cibles comme le gène *MMP-1* ou un promoteur « TORU » (élément de réponse aux facteurs ETS) (Goel and Janknecht, 2003; Goel and Janknecht, 2004; Papoutsopoulou and Janknecht, 2000). Le facteur Er81 interagit aussi avec ACTR et les membres de la famille p160, ce qui entraîne une augmentation de la transcription du gène de la *mmp1*. Il est intéressant de noter que ACTR coopère avec le coactivateur p300 pour stimuler la fonction transactivatrice du facteur Er81 (Goel and Janknecht, 2004). CBP/p300 peut aussi interagir avec le facteur Pea3 et permettre une meilleure transactivation de ses gènes cibles comme la *cox-2* (Liu *et al.*, 2004). Enfin, la protéine Pea3 interagit avec le facteur de transcription USF-1, permettant la régulation de l'expression de certains gènes sans fixation directe de Pea3 sur la chromatine (Firlej *et al.*, 2005; Greenall *et al.*, 2001).

2- Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles apportées aux protéines Pea3, Erm ou Er81 sont les suivantes la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation et l'ubiquitination. Ces modifications influencent leur fonctionnalité et leur interaction avec des partenaires.

a. La phosphorylation

La modulation de l'activité transactivatrice des facteurs du groupe PEA3 implique leur phosphorylation par des kinases : les MAP Kinases ERK-1 et ERK-2 activées par la voie RAS (Janknecht, 1996; Janknecht *et al.*, 1996; O'Hagan *et al.*, 1996). HER2/neu va pouvoir par leur intermédiaire et par la voie p38-MAPK, permettre la phosphorylation du domaine amino-terminal et ainsi permettre la transactivation de ses gènes cibles *smad7* et *MMP-1* (Bosc *et al.*, 2001; Dowdy *et al.*, 2003). Récemment, MSK1 et RSK-1 ont été montrés comme responsables de la phosphorylation du facteur Er81 *via* la voie p38-MAPK (MSK-1) et/ou ERK-MAPK (MSK- 1/RSK-1) selon les cellules considérées (Wu and Janknecht, 2002). La phosphorylation des sérines par MSK-1 *via* la voie p38-MAPK, comme par RSK-1 *via* la voie ERK-MAPK, permet d'activer le potentiel transactivateur du facteur Er81. On peut noter que MSK-1, comme RSK-1 peuvent aussi stimuler cette

transactivation *via* l'interaction avec CBP/p300. De même, la cascade d'activation des kinases JNK/SAPK intervient aussi dans l'augmentation du potentiel transactivateur de la protéine Pea3 (O'Hagan *et al.*, 1996). D'autre part, la protéine kinase A (PKA) est aussi capable d'activer la transactivation de la protéine Erm humaine (Baert *et al.*, 2002; Janknecht *et al.*, 1996), de la protéine Er81 humaine (Coutte *et al.*, 1999; Wu and Janknecht, 2002) et de la protéine Pea3 de poisson zèbre (Brown *et al.*, 1998). Néanmoins la phosphorylation du facteur Erm comme celle du facteur Er81 affecte leur capacité de liaison à l'ADN (Baert *et al.*, 2002; Wu and Janknecht, 2002). Récemment, une étude a montré l'interaction protéique entre LKB1 (une sérine/thréonine kinase) et le facteur Pea3. La phosphorylation du facteur Pea3 par ce facteur promeut sa dégradation par le protéasome (Upadhyay *et al.*, 2006).

b. L'acétylation

Comme d'autres membres de la famille ETS, un des membres du groupe PEA3 est connu pour être acétylé : le facteur Er81. p300 et la protéine P/CAF permettent une acétylation directe du facteur Er81 au niveau des lysines 33 et 116. L'acétylation permet une stabilisation de la protéine, augmente sa capacité de liaison à l'ADN et stimule la transactivation dépendante du facteur Er81 (Goel and Janknecht, 2003). Dans cette étude, il est démontré que HER2/neu, Raf et Ras stimulent *in vivo* l'activité histone acétyltransférase de p300 par phosphorylation de celle-ci et ainsi régule l'activité du facteur Er81 non seulement par phosphorylation mais aussi par acétylation.

c. La sumoylation

La sumoylation consiste en la liaison de façon covalente sur la protéine cible d'une petite protéine nommée SUMO (Small Ubiquitin like Modifier) sur un acide aminé lysine (K) contenu au sein d'un site consensus Φ KXE. Pea3, Erm et Er81 sont sumoylés ce qui a pour conséquence une diminution de leur capacité de transactivation (Bojovic and Hassell, 2008; Degerny *et al.*, 2008; Degerny *et al.*, 2005; Gocke *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2007). Concernant la protéine Erm, cet effet est assuré par la liaison de SUMO au niveau de 5 lysines sans affecter sa localisation, sa stabilité ni sa capacité de liaison à l'ADN (Degerny *et al.*, 2005). L'effet sur l'activité d'Erm est probablement associé à l'activation du domaine d'auto-inhibition de Erm suite à la liaison de SUMO (Degerny *et al.*, 2008).

En ce qui concerne Pea3 des données contradictoires ont été apportées récemment. Ces données indiquent que la sumoylation de Pea3 est nécessaire pour l'activation des promoteurs des gènes *mmp1* et *cox2* suite à l'activation de la voie des MAP Kinases (Guo and Sharrocks, 2009).

L'effet de la sumoylation sur l'activité des membres du groupe PEA3 est probablement dépendant du type de promoteur étudié (Nishida *et al.*, 2007). L'ensemble des données présentées ici étant réalisées sur des promoteurs différents explique peut être des résultats contradictoires.

d. L'ubiquitination

La protéine Pea3 est poly-ubiquitinilée dans sa région C-terminale, la protéine ainsi modifiée est alors relocalisée au niveau d'amas dans le noyau et sera prise en charge par le protéasome pour être dégradée (Takahashi *et al.*, 2005). Le facteur Erm est aussi ubiquitinilé, mais la forme majeure semble être une forme mono-ubiquitinilé. L'abolition de la polyubiquitination liée à la mutation de l'ubiquitine peut être corrélée avec l'augmentation de l'activité transcriptionnelle et l'inhibition de la voie du protéasome (Baert *et al.*, 2007).

VIII. Les gènes cibles des facteurs de transcription du groupe PEA3.

La régulation de l'activité de Pea3, Erm et Er81 permet de contrôler l'expression de gènes cibles qui sont importants pour les mécanismes du développement et du cancer dans lesquels les membres du groupe PEA3 jouent un rôle primordial. Un certain nombre de ces gènes cibles ont pu être identifiés ces dernières années. La recherche de ces gènes a été entreprise dans les différents contextes biologiques décrits précédemment et lors du développement embryonnaire ou de la progression de certains cancers (Figure 24).

De nombreux gènes cibles des facteurs de transcription du groupe PEA3 sont impliqués dans le contrôle des propriétés de migration, d'invasion, de prolifération ou de différenciation cellulaire ou encore d'apoptose.

1- Les gènes cibles impliqués dans les propriétés de migration et d'invasion cellulaires

Parmi ces gènes cibles se trouvent les gènes codant les enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire comme les gènes *mmp1*, *mmp2*, *mmp3*, *mmp7*, *mmp9*, *mmp13*, *mmp14* et *heparanase*. Les protéines codées par ces gènes permettent à la cellule de dégrader la matrice qui l'entoure et ainsi de progresser dans son environnement (Bosc *et al.*, 2001; Cowden Dahl *et al.*, 2007; Crawford *et al.*, 2001; Diaz-Sanjuan *et al.*, 2009; Hata *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2003; Monge *et al.*, 2007; Netzer *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2008). Les gènes codant les MMP possèdent au niveau de leur région promotrice, un site de régulation EBS/AP1 conservé au cours de l'évolution qui indique l'importance des facteurs de transcription du groupe PEA3 dans la régulation de ces gènes. L'ensemble de ces données a été obtenue dans des modèles cellulaires de tumorigenèse et notamment lors de la tumorigenèse de la glande mammaire.

- le gène *vimentine* impliqué dans la formation du cytosquelette notamment lorsque la cellule se déplace. Il est régulé par Pea3 dans des cellules cancéreuses de glande mammaire de souris, les cellules MMT (Chen *et al.*, 1996),
- les gènes *upa* et *upa-r* codant respectivement la protéine Upa et son récepteur Upa-R dans la glande mammaire de souris surexprimant Er81 (Netzer *et al.*, 2002),
- le gène *claudine5* régulé par Erm dans les cellules de la barrière hémato-testiculaire (Morrow *et al.*, 2009),
- le gène *beta 1-4 galactosyltransférase V* qui code une enzyme dont l'expression est régulée par Pea3 lors de l'invasion et la migration des cellules de gliomes (Jiang *et al.*, 2007b),
- le gène *twist* dont l'expression est contrôlée par le facteur de transcription Pea3 suite à l'activation de la voie Wnt ou la surexpression de l'oncogène *pymt* dans les cellules épithéliales de la glande mammaire (Howe *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2009),
- le gène *cyclooxygenase2*, régulé par Pea3, Erm et Er81 dans des modèles de cancérogenèse de la glande mammaire ou de l'ovaire (Eo *et al.*, 2008; Howe *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Subbaramaiah *et al.*, 2002)

- le gène *ostéopontine* est régulé par Pea3 dans les cellules de cancer du sein (El-Tanani *et al.*, 2004),
- le micro ARN *miR125a*. Il constitue le seul micro ARN régulé par Pea3 connu à l'heure actuelle. Pea3 régule son expression suite à une stimulation des cellules de tumeurs de l'ovaire. *miR125a* et Pea3 participent ainsi au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse dans ce modèle (Cowden Dahl *et al.*, 2009).

2- Les gènes cibles impliqués dans les propriétés de prolifération et de différenciation cellulaires

Parmi les gènes cibles de ces catégories se trouvent :

- des gènes de contrôle de la phase G1/S du cycle cellulaire *cycline D3* et *p21waf/cip*. Leur expression est régulée par Pea3, respectivement dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus suite à un stress génotoxique (Funaoka *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2007a),
- le gène *sdf1* codant une chemokine. Son expression est régulée par Erm dans les cellules souches germinales de testicule ((Cowden Dahl *et al.*, 2009),
- le gène *htert* codant une sous unité de la télomérase et impliqué dans le potentiel répliatif infini des cellules cancéreuses est régulé par Er81 (Goueli and Janknecht, 2004),
- le gène *krox20* impliqué dans la segmentation et du rhombencéphale (Weisinger *et al.*, 2010),
- le gène *dup6* lors de la mise en place du cœur chez le poisson zèbre. Ce gène est impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation de cellules progénitrices cardiaques (Molina *et al.*, 2009; Znosko *et al.*, 2010),
- le gène *spalt4* pendant la mise en place de l'oreille chez le poulet (Barenbaum and Bronner-Fraser).
- les gènes *smad7* et *tgfbr2* codant des protéines de la voie de signalisation du TGF Bêta: Pea3, Erm et Er81 régulent l'activité du promoteur du gène *smad7* en synergie avec le récepteur Her2/Neu, selon une voie impliquant les MAP kinases (Dowdy *et al.*, 2003) ;

Pea3 régule l'activité du promoteur du gène *tgfbr2* dans les cellules de carcinome embryonnaire différenciées (Kopp *et al.*, 2004).

3- Les gènes cibles impliqués dans le contrôle de l'apoptose

C'est le cas du gène *bax* qui est régulé par les facteurs de transcription du groupe PEA3 dans les cellules épithéliales mammaires et dans des cellules cancéreuses suite à un stress génotoxique (Firlej *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2008).

Parmi les gènes cités précédemment, les gènes *mmp2*, *mmp9* (Qin *et al.*, 2008), *héparanase* (Lu *et al.*, 2003), *vimentine* (Chen *et al.*, 1996), *upa* et *upar* (Netzer *et al.*, 2002), *twist* (Howe *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2009), *cox2* (Eo *et al.*, 2008; Howe *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Subbaramaiah *et al.*, 2002), *cycline D3* (Jiang *et al.*, 2007a), *ostéopontine* (El-Tanani *et al.*, 2004) et *htert* (Goueli and Janknecht, 2004) sont les seuls avoir été caractérisés comme gènes cibles des membres du groupe PEA3 dans des modèles de cancérogenèse mammaire. Concernant les gènes régulés dans un contexte de cellules mammaire non transformées seul le gène *bax* à pu être identifié (Firlej *et al.*, 2005).

Au vu de ces données il est maintenant important d'élargir la connaissance des gènes régulés par les membres du groupe PEA3 lors des étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires afin de mieux appréhender leur rôle lors de ces événements.

IX. CONCLUSION

Les facteurs de transcription Pea3, Erm et Er81 sont importants pour le développement de divers organes, notamment ceux se mettant en place par morphogenèse de branchement comme la glande mammaire. Leur activité est finement régulée par un ensemble de signaux (voies de signalisations, modifications post traductionnelles, interactions protéiques) ce qui permet la régulation de gènes spécifiques dont peu sont encore connus. En conditions pathologiques, lorsque ces mécanismes de régulation sont altérés les membres du groupe PEA3 participent alors au développement des cancers, comme le cancer du sein (Figure 24).

I. Oligonucléotides utilisés

Utilisation	Nom	Séquences des oligonucléotides (5'(N)3')
Clonage du promoteur du gène <i>cycline d2</i>	Pr CycD2 -64 S	AATTCGGGGCAGTTTCGGAGGGAAGGACCGGTGCGAGTC AGGCGGCCCTTGAGGCTCCGCTCGCCACCTG
	Pr CycD2 -64 AS	AATTCAGGTGGGCGAGCGGAGCCTCAAGGGCCGCCTGA CTCGCACCGGTCCTTCCCTCCGAACCTGCCCGG
	Pr CycD2 -113S	AGCTTGCGTCACTGCCTGAGCGAG
	Pr CycD2 -168S	GGGAGGAAAAGGGGAGGAGGAACCTG
	Pr CycD2 -258S	CAGGCCAGCTGCTGTGCTCC
	Pr CycD2 -450AS	AGGTGGGCGAGCGGAGCCTCAAG
	Pr CycD2 -625S	GCACACACGTACACACCCTT
	Pr CycD2 -1629S	ACAGCGTGCCACCCCCTCC
	Pr CycD2 -1629AS	AGCCAGCCGGCCACCACTCGGTCCCGACTG
RT-PCR	36b4 S	CTTCTCCTTCGGGCTGATCA
	36b4 AS	GGGTACCCGATCTGCAGACA
	cdkn2b S	GGTGGGTGCAGTCAGTACCT
	cdkn2b AS	CGAGCTGGAGGTGACTTCTC
	cripto1 S	ATTGACCCGTTGCTGGGAGAGA
	cripto1 AS	CAGCTAGCATAAAAAGTGGTGGTCTCGTCA
	eyeD2 S	CTGGATGCTAGAGGTCTGTGAG
	eyeD2 AS	CGGATCAGGGACAGCTTCT
	eyeD2 S QPCR	CTGCTGGAGTGGGAACCTGGTA
	eyeD2 AS QPCR	GATGAAGGTCTGCGCATGCT
	eyeD2 tre S	CTGGATGCTAGAGGTCTGTGAG
	eyeD2 tre AS	TTAGTGTGGCGGCCTTAGTG
	eyeD2 tre S QPCR	AAAGCTATCAGTGCCTCATGGAA
	eyeD2 tre AS QPCR	CCCACCCACACACACAACA
	cyclophiline S	GCATACAGGTCCTGGCATTTGTCC
	cyclophiline AS	ATGGTGATCTTCTTGTGGTCTTGC
	cyclophiline S QPCR	TGTGCCAGGTTGGTACTT
	cyclophiline AS QPCR	GGGAACCGTTTGTGTTTGGT
	gapdh S	GATGCCCCATGTTTGTGAT
	gapdh AS	GGTCATGAGCCCTTCCACAAT
	hgf S	TGACCCAAAACATCCGAGTTGGCTA
	hgf AS	GGAATGCCATTTACAACCCGAGT
	mmp13 S	ATCCTGGCCACCTTCTTCTT
	mmp13 AS	TTTCTCGGAGCCTGTCAACT
	mmp9 S	ACGTGGGTCGATTCCAAACC
	mmp9 AS	GGAAAGGCGTGTGCCAGAAG
	pea3 S	CGACTCAGATGTCCCTGGAT
pea3 AS	ACGTTGATTATCTGGGAAGG	
pea3 S QPCR	CGGTCAAACCTCAGCCTCAGA	
pea3 AS QPCR	CGGTCAAACCTCAGAATCAGA	
twist1 S	CGGGTCATGGCTAACGTG	
twist1 AS	CAGCTTGCATCTAACGTG	
Immunoprécipitation de la chromatine	promoIP cd2 S	AGGTGGGCGAGCGGAGCCTCAAG
	promo IP cd2 AS	GAGAGGGAGGGAAAAGATTGAAAAGGA
	promo IP icam1 S	CTGGGCATCAGTTCGGATTA
	promo IP icam1 AS	GGCGAGAGGCAGCGGCAGTG
Mutagenèse dirigée des sites EBS 1, 2 et 3	promo cd2 mut 1 et 2 S	GGAGGGGACCAAAGGGGAGGACCAACCTGAGAG
	promo cd2 mut 1 et 2 AS	CTCTCAGGTTGGTCTCCCCCTTGGTCCCCTCC3
	promo cd2 mut 3 S	CAGTGACGCAAGCTAGAAGGGCAGTTAGATC
	promo cd2 mut 3 AS	GATCTAACTGCCCTTCTAGCTTGCCTACTG

Tableau 2. Nom et séquences des oligonucléotides utilisés pour le clonage du promoteur du gène *cycline d2*, les expériences de RT-PCR, les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et de mutagenèse dirigée.

II. Culture cellulaire

Plusieurs lignées de cellules sont utilisées :

- les TAC (cellules épithéliales mammaires de souris) dérivant de NMuMG (cellules épithéliales mammaires normales TACC CRL-1636) fournies par le Dr J. Soriano & le Pr R. Montesano (Faculté de Médecine, Département de Morphologie, Genève) (Soriano *et al.*, 1995). A partir de ces cellules ont été établis les clones cellulaires surexprimant Pea3 établis (TAC Pea3 8) ou contrôles (clone TAC pc7) (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003) et les populations de cellules infectées par des rétrovirus et surexprimant Pea3 (TAC PLPCX Pea3-V5) et les cellules témoins (TAC PLPCX),
- les cellules MMT (cellules mammaires cancéreuses de souris ATCC CCL-51).
- les cellules HEK293 GP (cellules productrices de virus, ATCC CRL-1573) sont utilisées pour la production de rétrovirus.

Les cellules TAC, MMT et HEK293 GP sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété par 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Life Technologies, Invitrogen®, DMEM 10% SVF), 1% d'acides aminés non essentiels et 100 unités de gentamycine, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂. Les cellules TAC nécessitent la présence de collagène (30 µg/ml) sur le support plastique afin d'y adhérer. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont décollées de leur support et dissociées par une solution de trypsine-EDTA (Cambrex).

III. Transfection cellulaire

1- Vecteurs plasmidiques

a. Vecteurs d'expression

Nous avons utilisé les vecteurs d'expression suivants :

- pTracer (Life Technologies, Invitrogen®), pTracer-Pea3-V5, pTracer-Cycline D2-V5 et pTracer Cycline D2 Trc-V5 contenant respectivement les ADN complémentaires (ADNc) *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* murins clonés en aval du promoteur fort EF-1 α et en phase avec le cadre de lecture ouvert de la séquence codant l'étiquette V5 (Firlej *et al.*, 2005) et données non publiées),

- PLPCX (Clontech), PLPCX Pea3-V5, PLPCX Cycline D2-V5 et PLPCX Cycline D2 Trc-V5 contenant les ADN complémentaires *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* murins en aval du promoteur fort du Cytomégalo virus et en phase avec le cadre de lecture ouvert de la séquence codant l'étiquette V5. Ces plasmides ont été obtenus par amplification par PCR de la séquence d'ADNc contenus dans le vecteur pTracer en utilisant un couple d'oligonucléotides encadrant la séquence d'ADN complémentaire et la séquence codant l'étiquette V5.

b. Vecteurs rapporteurs

Les fragments de délétion du promoteur du gène *cycline d2* (1629, 625, 450, 258, 168, 113, 64) ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN génomique de souris au moyen de l'enzyme Taq polymérase haute fidélité Phusion® (Finnzyme), grâce aux oligonucléotides indiqués « Pr CycD2 » (-1629S, -1629AS, -625S, -450AS, -258S, -168S, -113S, -64S) dans le tableau 2. Ces fragments ont été sous-clonés dans le vecteur TOPO PCR 2.1 (Invitrogen). Puis par double digestion par les enzymes XhoI et KpnI, ces fragments sont isolés et clonés dans le vecteur pGl4b en aval de la séquence codante du gène *luciférase* 'firefly' (*Photinus pyralis*, Promega).

c. Vecteur normalisateur

Dans les expériences de caractérisation d'activité transcriptionnelle en transfection transitoire nous avons utilisé le vecteur pRL-TK (Promega) contenant le gène codant la Luciférase Renilla sous le contrôle du promoteur minimal du gène *thymidine kinase* du virus Herpès *simplex*.

2- Transfection des cellules

a. Transfection des vecteurs plasmidiques

- **Pour les tests d'activité rapportrice**

Les cellules sontensemencées la veille dans des plaques 24 puits à raison de 30000 cellules par puits. L'agent de transfection est un polymère d'éthylènimine (PEI, ExGen 500, Euromedex). Le mélange de transfection contient : 250 ng d'ADN final (comprenant 25 ng de vecteur rapporteur, 25 ng de vecteur normalisateur et 100 ng de

vecteur d'expression) et 10 pmoles de PEI. Le contact ADN/PEI est réalisé sous 100 µl final dans de l'eau physiologique pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'OPTIMEM (milieu sans sérum, Life Technologies, Invitrogen®), puis mises en culture avec 500 µl d'OPTIMEM. Le mélange ADN/PEI est déposé sur les cellules. Au bout de 6 heures, le milieu est complété par 1,5 ml de DMEM 10% SVF transfection.

- **Pour l'immuno-précipitation de la chromatine, l'établissement des clones cellulaires et les infections rétrovirales**

Les cellules TAC et HEK293 GP sont respectivementensemencées la veille dans des boîtes de 100 mm à raison de 1.10^6 et $2,5.10^6$ cellules par boîtes. L'agent de transfection est un polymère d'éthylènimine (PEI, ExGen 500, Euromedex). 240 pmoles de PEI sont dilués dans 600 µl d'eau physiologique. Puis une solution contenant 6 µg de vecteur plasmidique dans 600 µl d'eau physiologique est ajoutée à 600 µl du mélange PEI/eau physiologique et le tout est mis à incuber à température ambiante pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'eau physiologique et 10 ml de milieu de transfection OPTIMEM (GIBCO) sont ajoutés. L'ensemble cellules et complexes PEI-ADN est mis à incuber à 37°C. Après 5 heures de transfection le milieu est renouvelé avec du milieu DMEM 10% SVF.

b. Transfection transitoire des séquences siRNA

L'agent de transfection est une molécule lipidique (Lipofectamine 2000, Invitrogen). La lipofectamine 2000 est diluée dans du milieu de transfection OPTI MEM (GIBCO) à une concentration de 20 µg/mL. Puis une solution contenant 100 pmoles de siRNA dans 250µl de milieu OPTIMEM est ajoutée à 250 µl du mélange Lipofectamine 2000/OPTI MEM et mis à incuber à température ambiante pendant 20 minutes. Une suspension de cellules contenant 180000 cellules dans 2 ml de milieu DMEM 10% SVF sans antibiotiques est mise en contact avec les complexes Lipofectamine 2000-siRNA. L'ensemble cellules et complexes lipofectamine 2000-siRNA est mis à incuber dans un puits de plaque 6 puits à 37°C. Après 5 heures de transfection le milieu est renouvelé avec du milieu DMEM 10% SVF sans antibiotique.

3- Dosage des activités rapportrices et normalisatrices

48 heures après la transfection (Paragraphe III.2.a.) les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X et lysées dans 75 µl de tampon de lyse « Passive Lysis Buffer » (Promega). Le dosage est réalisé par l'intermédiaire du Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) qui permet à partir du même extrait de lysat cellulaire de quantifier à la suite les activités rapportrice (Luciférase 'Firefly') et normalisatrice (Luciférase 'Renilla'). Le réactif « luciférase » est additionné à 20 µl du lysat cellulaire. Ce réactif contient de la Luciférine qui lorsqu'elle est dégradée par la Luciférase 'Firefly', émet de la lumière. L'activité est alors mesurée à l'aide d'un luminomètre LUMAT 9501 (Berthold). Le dosage de l'activité de la Luciférase 'Renilla' exprimée par le vecteur pRL-TK est réalisé par ajout de réactif 'Stop & Glo[®]' qui stoppe l'activité de la Luciférase 'Firefly' et permet la mesure de l'activité de la Luciférase 'Renilla'. L'activité de la séquence promotrice étudiée et placée en amont de la séquence codant la Luciférase 'Firefly' est finalement estimée en faisant le ratio de l'activité 'Firefly' sur l'activité 'Renilla'.

4- Etablissement des clones cellulaires

Les cellules sont transfectées avec le vecteur plasmidique pTracer Cycline D2-V5 ou pTracer Cycline D2 Trc-V5 contenant une cassette de résistance à la néomycine, selon le protocole décrit dans le paragraphe III.2.a. 24 heures après la transfection les cellules contenant le vecteur plasmidique d'intérêt sont cultivées dans du milieu de culture DMEM 10% SVF contenant 800 µg/ml d'antibiotique néomycine (G418, GIBCO). Les clones cellulaires ayant acquis la résistance à l'antibiotique à l'issue d'une semaine de culture sont amplifiés et l'expression des protéines Cycline D2-V5 et Cycline D2 Trc-V5 est vérifiée par la technique de Western blot.

5- Infection des cellules par des rétrovirus

Pour la production virale, les cellules HEK 293 sontensemencées la veille à raison de $2,5 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 100 mm et sont ensuite co-transfectées avec 5 µg de vecteur pLPCX et 1 µg de vecteur pCMV-VsVg. Le milieu de culture est renouvelé après 6h de transfection. Après 48 heures d'incubation à 37°C, les surnageants contenant les particules virales sont collectés, filtrés et utilisés pour l'infection des cellules TAC. $3 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 100 mm sont incubées avec les surnageants en présence de 0,4 µg/ml de polybrène

(Sigma). La sélection commence 24 heures après en présence de 2 µg/ml de puromycine (Gibco BRL).

IV. Etude de l'expression des ARN messagers

1- Extraction des ARN

c. Méthode d'extraction au « Trizol » (Invitrogen)

Les ARN des tumeurs issues de l'injection des cellules TAC Pea3-8 en souris immunodéficientes sont extraits par lyse des tumeurs dans le Trizol et dissociation mécanique en utilisant un mixer Polytron. L'homogénat obtenu est placé pendant 15 minutes à 4°C pour dissocier les complexes nucléoprotéiques. Après addition d'1/5ème de volume de chloroforme, le mélange est alors centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARN situés dans la phase supérieure sont ensuite précipités par un volume d'isopropanol puis centrifugés à 12000 g pendant 30 minutes. Le culot obtenu est lavé avec une solution d'éthanol 70% puis repris dans de l'eau. La concentration des ARN est établie par spectrophotométrie à 260 nm.

d. Méthode d'extraction et de purification sur colonne d'affinité

Pour les études d'analyse de gène par RT-PCR semi-quantitative et quantitative, les ARN sont extraits et purifiés sur colonne en suivant le protocole fourni par Macherey Nagel (Nucleospin RNA II). Les ARN sont extraits à partir de cellules sub-confluentes préalablement lysées dans un tampon de lyse fourni et purifiés par passage sur colonne. L'ADN génomique présent dans les échantillons est digéré par une DNase selon les recommandations du fournisseur. Les ARN sont alors élués dans de l'eau RNase free. La concentration des ARN est établie par spectrophotométrie à 260 nm.

2- Rétrotranscription des ARN et PCR

a. Rétrotranscription des ARN (RT-PCR)

1 µg d'ARN extraits et purifiés sur colonne sont rétrotranscrits grâce à la transcriptase reverse MMuLV et des hexanucléotides du kit « High Capacity cDNA archive kit » (Applied Biosystems) selon le protocole donné par le fournisseur.

b. PCR semi-quantitative

Les réactions de PCR semi-quantitative ont été réalisées au moyen de l'enzyme Taq polymérase Go Taq (Promega) en présence de 1,6 mM MgCl₂, 0,2 nM dNTP, 0,2 μM d'oligonucléotides sens et antisens et de 0,6 unités de Taq polymérase pour un volume de 22,5 μl par réaction. A ce mélange sont ajoutés 2,5 μl d'ADNc dilués au 1/10^{ème} pour un volume final de 25 μl par réaction. La réaction de PCR consiste en une étape de 5 min à 95°C, puis x cycles d'amplification (en fonction du gène analysé) (95°C pendant 30s, 52°C pendant 30s puis 72°C pendant 30s), puis une élongation finale de 5 min à 72°C, les oligonucléotides utilisés pour les expériences de PCR semi-quantitative sont présentés dans le tableau 2. Les échantillons sont ensuite analysés par migration électrophorétique dans un gel d'agarose concentré à 2% en présence de bromure d'éthidium à une concentration de 0,5 μg/ml.

c. PCR quantitative par la technique de « SyBr Green »

Les réactions de PCR quantitative sont faites à l'aide du « Fast SyBr green mix » (Applied Biosystems). 1/40^{ème} de la réaction de rétrotranscription est mélangé au « master mix » contenant du Rox (un marqueur fluorescent permettant de normaliser la réaction), en présence de 6 pmoles de chaque amorce pour un volume final de 10 μl. La réaction est placée dans l'appareil MX3005P (Stratagene). Le protocole d'amplification consiste en une dénaturation initiale de 95°C pendant 20 secondes puis 40 cycles d'amplification composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 secondes et une étape de polymérisation/élongation à 60°C pendant 30s. La fluorescence émise par le SyBr Green est mesurée à la fin de chaque étape d'amplification. La courbe de fusion des différents couples d'oligonucléotides est faite au moyen d'une étape de 1 minute à 95°C puis une hybridation pendant 30s à 55°C suivie d'une montée progressive à 95°C de 1°C toutes les 30s. La fluorescence est mesurée toutes les 30s. L'analyse des résultats de PCR en temps réel est faite par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ selon le calcul suivant : $2^{-(\text{condition témoin (Ct gène analysé} - \text{Ct gène analysé référent})) - (\text{condition test (Ct gène analysé} - \text{Ct gène analysé référent}))}$ où 'Ct gène analysé' correspond aux nombres de cycles nécessaires pour détecter le signal spécifique de l'amplification du gène dont analyse l'expression et où 'Ct gène référent' correspond aux nombres de cycles nécessaires pour détecter le signal spécifique de l'amplification du gène référent. Les différents oligonucléotides utilisés pour

les expériences de PCR quantitative ainsi que leurs séquences sont répertoriés dans le tableau 2.

V. Mutagenèse dirigée

La mutation des motifs EBS (ETS Binding Site) est réalisée par substitution de 1 à 4 nucléotides au sein de la séquence du promoteur cloné dans le vecteur rapporteur pGI4b. Les mutations sont introduites dans la séquence d'une amorce sens et d'une amorce anti-sens d'environ 30 nucléotides (tableau 2) qui servent d'ancrage à la Taq polymérase haute fidélité Phusion® (Finnzyme) pour la néo-synthèse d'un vecteur plasmidique muté. Le milieu réactionnel contient 100 ng de plasmide auxquels sont ajoutés le tampon de l'enzyme Phusion à une concentration finale 1X, 0,2nM de dNTP, 125ng de chaque amorce sens et anti-sens et 1 unité de polymérase Phusion. Le programme du thermocycleur est : 98°C pendant 30 secondes puis 25 cycles de 98°C/10 secondes, 48°C/30 secondes, 72°C/5minutes et une élongation finale de 72°C/5 minutes. La matrice de départ est éliminée par digestion enzymatique (10 unités d'enzyme *Dpn I*, 37°C pendant 1 heure). Les plasmides portant la mutation sont introduits par transformation dans des bactéries *Escherichia coli*. La présence des mutations est vérifiée par séquençage (société Genoscreen, Institut Pasteur de Lille).

VI. Immuno-précipitation de la chromatine (ChIP)

1- Préparation des lysats cellulaires

Chaque boîte de 100 mm de cellules en culture sub-confluente est rincée 3 fois avec une solution de PBS 1X et les cellules sont fixées par 10 ml d'une solution de paraformaldéhyde 1% dans du PBS 1X, à température ambiante pendant 10 minutes sous agitation. La fixation est stoppée par ajout de 600 µl d'une solution de glycine 2,5M à température ambiante pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de PBS 1X et décollées par grattage. Pour chaque condition étudiée, le contenu de 3 boîtes de 100 mm est rassemblé et les cellules sont lavées 3 fois par une solution de PBS 1X et une série d'étapes de centrifugation à 3500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les culots de cellules sont lysés dans du tampon de lyse I et soumis à une étape de sonication à 4°C en utilisant le sonicateur Bioruptor® (Diagenode) à la puissance maximale, pendant 10

minutes avec des cycles de sonication de 30 secondes espacés de 30 secondes. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 10500 rpm pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. A cette étape 40 µl de lysat sont prélevés et constituent les « INPUTS ». Le reste du lysat est incubé à 4°C pendant 4 heures sous agitation circulaire dans 400 µl de tampon de dilution dans lequel sont ajoutés 35 µl de billes protéine G sépharose (Sigma), 40 µg d'ADN génomique de sperme de saumon et 17 µg de BSA. Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 5200 rpm pendant 2 minutes à 4°C.

2- Immunoprécipitation des complexes protéines-chromatine

4 µg d'anticorps anti Pea3 sc113X (Santa Cruz) ou d'anti IgG non spécifique (anticorps anti Bax, sc-7480 Santa Cruz) sont ajoutés aux lysats cellulaires et le tout est mis à incuber à 4°C pendant la nuit sous agitation circulaire. Le mélange lysat cellulaire-anticorps est ensuite centrifugé à 14000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. 45 µl de tampon de dilution contenant 45 µl de billes protéine G sépharose sont ajoutés au surnageant et l'ensemble est mis à incuber à 4°C pendant 4 heures sous agitation circulaire. Les billes de protéine G sépharose associées aux complexes protéines-Chromatine sont ensuite lavées dans 4 ml de tampon de dilution, à 4°C pendant 10 minutes sous agitation circulaire suivie d'une étape de centrifugation à 5200 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Cette étape de lavage est répétée avec les tampons TSEI, TSEII, Tampon III puis 3 fois dans une solution de Tris 1M EDTA 0,5M.

3- Purification de la chromatine et analyse par PCR

Les complexes protéines-chromatine sont libérés par ajout de 250 µl de tampon d'élution (en parallèle 250 µl de tampon d'élution sont ajoutés aux « INPUTS ») et mis en incubation à température ambiante pendant 15 minutes sous agitation circulaire. Enfin les complexes protéines-chromatine sont cassés par ajout de 33,2 µl de chlorure de sodium et incubation à 65°C sur la nuit. Suite, à cela les ARN et protéines présents dans l'immunoprécipitat sont éliminés par ajout de 5,2 µl d'une solution d'EDTA 500 mM additionnée de 10 unités d'un mélange d'enzyme RNase A/RNase T1 (Fermentas) et incubation à 37°C pendant 30 minutes, puis par ajout de 20 µg d'enzyme protéinase K et incubation à 55°C pendant 1 heure. Enfin, le surnageant est récupéré après une étape de centrifugation à 3000g pendant 5 minutes et les fragments de chromatine qu'il contient

sont purifiés à l'aide du kit de purification sur colonne « Wizard PCR » Clean Up (Promega) selon les recommandations du fournisseur puis élués dans 25 µl d'eau.

L'analyse des fragments de chromatine se fait par PCR selon le protocole décrit dans le paragraphe IV.2.b. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau 2.

VII. Analyse des protéines par la technique de Western blot

1- Extraction des protéines

Les cellules en culture sub-confluentes sont rincées avec une solution de PBS 1X, puis lysées pendant 30 minutes à 4°C dans du tampon de lyse protéique RIPA contenant 1% SDS à raison de 100 µl/boîte de 100 mm). L'extrait cellulaire est homogénéisé par sonication en utilisant un sonicateur Bioruptor® (Diagenode) et centrifugation à 10000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors conservé. La concentration des protéines est déterminée par dosage des protéines par la méthode à l'acide bicinchoninique (BC Assay Protein Quantitation kit, Interchim).

2- Préparation et migration des échantillons

50 à 80 µg de protéines sont diluées dans une solution de Laemmli et dénaturées par chauffage à 95°C pendant 10 minutes. Les protéines sont alors déposées dans un gel d'acrylamide/bisacrylamide dénaturant pour l'étape de migration électrophorétique (gel de séparation de 4,5%/ gel de concentration de 10-12%). La migration électrophorétique s'effectue dans le tampon de migration. Dans ces conditions les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire.

3- Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C extra, Amersham Pharmacia Biotech) selon une technique de transfert semi-sec, pendant 90 minutes sous un champ électrique de 120 mV. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge ponceau.

4- Révélation immunologique

La membrane est placée dans une solution de PBS 1X Tween (Tris Buffer Saline) contenant 5% de BSA (Bovine Sérum Albumine) pendant au moins une heure. L'anticorps primaire est dilué dans le tampon PBS 1X Tween contenant 5% de BSA (anticorps anti Cycline D2, M20 Santa Cruz, Inc dilué au 1/1000^{ème}; anticorps anti Pea3 Thermo Fisher dilué au 1/200^{ème}) et incubé avec la membrane pendant une nuit. La membrane est ensuite lavée quatre fois dix minutes dans une solution de PBS 1X NP-40 0,1% puis incubée pendant une heure avec un anticorps secondaire anti lapin couplé à la peroxydase (Jackson LTD), dilué au 1/10000^{ème}. Après rinçage par une solution de PBS 1X, la détection est effectuée par chimioluminescence en ajoutant le substrat de la peroxydase mélangé à un catalyseur (système ECL Western Blotting detection reagent, AmershamTM), la luminescence est détectée par le système d'imagerie LAS 3000 imager (Fujifilm).

5- Immunoprécipitation

La détection de la protéine Cycline D2 Trc-V5 par une technique de Western blot, dans les cellules clones cellulaires issus des cellules TAC a nécessité une étape préalable d'immunoprécipitation. Les TAC Cycline D2 Trc-V5 cultivées à sub-confluence dans une boîte de culture de 100 mm ont été lavées deux fois avec du PBS 1X et décollées en ajoutant 2 ml d'une solution de trypsine EDTA (GIBCO). Les cellules ont ensuite été récupérées par centrifugation à 3000 rpm pendant 5 minutes et lysées dans 600 µl de tampon de lyse IP.

Après une étape de centrifugation à 14000 rpm pendant 90 minutes à 4°C pour éliminer le débris cellulaires, le surnageant est réparti de façon égale dans deux tubes. 1,5 volume de tampon de dilution IP est ajouté par tube. L'un des deux tubes reçoit alors 2 µg d'anticorps anti-V5 et l'autre 2 µg d'un anticorps non relevant, ici un anticorps dirigé contre la protéine Bax. Ces mélanges sont mis à incuber à 4°C pendant 24 heures sous agitation circulaire.

Ensuite, 20 µl de billes de protéine G sépharose (Sigma) sont ajoutés dans chacun des tubes qui sont alors incubés à 4°C pendant 1 heure sous agitation.

Enfin les complexes Anticorps-Antigènes sont détruits et les protéines récupérées par centrifugation des billes de protéine G sépharose à 5400 rpm pendant 30 secondes à 4°C et les billes sont ensuite reprises dans 30 µl de tampon Laëmli.

VIII. Puces à ADN

Pour l'étude des modulations transcriptionnelles entre différentes conditions expérimentales, des puces à ADN « Mouse Genome Survey Microarrays » (Applied Biosystems) ont été utilisées. Ces puces contiennent des sondes oligonucléotidiques de 60 mers permettant de suivre l'expression de 28218 gènes murins validés. Les ARN totaux extraits des cellules MMT transfectées par un siRNA dirigé contre *pea3* (ou un siRNA contrôle) et des cellules TAC Pea3-8 (ou des cellules contrôles TAC pc-7) et purifiés grâce au système de colonne Macherey Nagel (Paragraphe IV.1.b.), sont testés par l'utilisation de puces « Agilent[®] », pour vérifier leur qualité. Ces puces consistent en un réseau capillaire très fin dans lequel est déposé un gel contenant un intercalant spécifique de l'ARN. Les échantillons sont déposés dans chaque puits de la puce et vont être soumis à un haut voltage, qui va permettre une séparation très rapide des brins d'ARN de l'échantillon en fonction de leur taille. Les molécules d'ARN vont se lier à l'intercalant et en fin de course vont être détectés par fluorescence. L'appareil mesure l'intensité de la fluorescence qui dépend du temps de rétention dans le gel. Après validation de leur qualité, 1,2 µg d'ARN totaux sont alors amplifiés par le « NanoAmp™ RT-IVT labelling kit », puis marqués avec la DIG-UTP selon le protocole fourni par Applied Biosystems. Cette étape consiste en une rétrotranscription de l'ARN en ADNc. Le second brin de l'ADNc est ensuite polymérisé en miroir du brin d'ADNc. L'ADNc double brin ainsi obtenu est purifié sur colonne. L'ADNc double brin est alors transcrit *in vitro* en présence d'UTP marqué à la digoxygénine. L'ARNc marqué à la DIG est purifié sur colonne et dosé.

Ensuite, 10 µg d'ARNc marqués sont hybridés pendant 18h sur une puce à ADN et traités selon le protocole fourni (Chemiluminescence Detection Kit, Applied Biosystems Biosystems). Brièvement, après rinçage, les puces à ADN sont mises en présence d'un anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase. Les lames seront révélées en présence d'un substrat dégradé par la peroxydase qui émet alors de la lumière qui est quantifiée dans l'appareil « Applied Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarrays analyser ». L'acquisition des données de chimioluminescence de même que l'analyse primaire des

résultats de puces à ADN est effectuée au moyen du logiciel Applied Biosystems Expression Array System Software v1.1.1. L'étude primaire consiste en 5 étapes : une correction d'image, une correction du bruit de fond local et global, puis 3 étapes de normalisation. Enfin, une normalisation finale est apportée par le logiciel *ace.map* mis au point par l'équipe du Dr Arndt Benecke. Les profils d'expression et l'analyse statistique ont été réalisés grâce au logiciel *ace.map* (Brysbart *et al.*, 2007). La normalisation entre les expériences a été faite par la méthode NeONORM (Noth *et al.*, 2006). La valeur de la probabilité p est faite selon les tests standards. Les gènes référencés dans la puce par des numéros d'identité (probe-ID) ont alors été annotés selon le guide décrit précédemment (Noth and Benecke, 2005).

IX. Etudes phénotypiques

1- Analyses in vivo par injection en souris immunodéficientes

Les clones cellulaires TAC pea3-8 et TAC pc-7 ont été injectées dans la glande mammaire numéro 4 gauche de souris femelles SCID pré-pubères c'est à dire âgées de 3 semaines environ. Les cellules sont décollées puis comptées. Après 2 rinçages au PBS 1X, les cellules sont suspendues à une concentration de $1,7.10^6$ cellules par ml dans du PBS 1X. 30 μ l de cette solution sont ensuite injectés dans la glande mammaire.

a. Technique de recolonisation de la glande mammaire

Pour les expériences de recolonisation de la glande mammaire, l'arbre épithélial en début de formation est éliminé par cautérisation et les cellules sont injectées dans le tissu adipeux de la glande mammaire « Fat Pad ». La recolonisation du « Fat Pad » par les cellules injectées est analysée 1 mois après la date d'injection après prélèvement de la glande et coloration du tissu épithélial. La glande est déshydratée dans des bains d'éthanol 100% puis 70% puis incubée dans une solution de carmin 2 μ g/ml pour colorer les cellules épithéliales. La glande est finalement écrasée entre deux lames de verre pour être visualisée par microscopie.

b. Technique d'induction de tumeurs

Pour les expériences d'induction de tumeurs les cellules sont injectées directement dans la glande mammaire sans désépithélialisation préalable. Une mesure de la longueur et de la largeur de chaque tumeur au travers de la peau de l'animal est effectuée chaque semaine dès l'apparition des masses tumorales. Le volume de chaque tumeur est alors calculé selon la formule mathématique suivante $(\text{largeur} \times (\text{hauteur})^2) / 2$. L'analyse macroscopique de la présence de métastases dans les organes de la souris est vérifiée visuellement.

c. Analyse histologique des poumons

La présence de métastases dans les poumons est réalisée par histologie et coloration du tissu pulmonaire. Après prélèvement les poumons sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant une nuit puis déshydratés dans des bains successifs à teneur croissante en éthanol. Les échantillons sont ensuite perméabilisés par des bains de toluène et inclus dans la paraffine à 56°C. Des coupes de 5 à 7µm d'épaisseur sont réalisées et posées sur lame de verre et séchées. Puis les coupes sont perméabilisées par des bains successifs d'alcool de 100 à 50%, hydratées par un bain dans de l'eau désionisée et colorées pendant 20 secondes avec une solution d'hématoxyline de Harris. L'hématoxyline colorant les noyaux cellulaires en bleu l'organisation cellulaire des tissus et la présence de métastases devient visualisable par microscopie optique.

2- Culture des cellules dans un gel tridimensionnel de collagène

Sur la glace, 500 µl d'un gel de collagène (collagène de type I à la concentration de 2 mg/ml de MEM en présence de 2,2 g/ml de bicarbonate de soude et 0,0048N de soude) sont mélangés à 4000 cellules contenues dans un volume de 10 µl de milieu de culture DMEM. L'ensemble cellules-gel est placé au fond d'un puits de plaque de culture de 3,5 cm² et incubé à 37°C pendant 30 minutes pour polymériser le gel. Après polymérisation, du milieu DMEM 10% SVF est ajouté sur le gel. Si besoin l'HGF est ajouté le lendemain à la concentration de 20 ng/ml. La culture est maintenue pendant 7 à 10 jours, puis une coloration des cellules est réalisée à l'aide d'une solution de rouge neutre pendant 1h. Une fixation des structures est enfin réalisée à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde

concentré à 4 %. L'analyse visuelle est réalisée avec un microscope inversé (Leica, DM IR30).

3- Analyse de la prolifération cellulaire par comptage

Les cellules de chaque condition testée sont ensemencées en triplicat à raison de 5800 cellules par cm². Selon les besoins de l'expérience, 24 à 48 heures après l'ensemencement, les cellules sont lavées avec une solution de PBS 1X, décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Cambrex) et comptées trois fois à l'aide d'un compteur de cellules de type « Coulter Counter » (Beckman). Le comptage est répété aux différents temps nécessaires pour chaque expérience. Si l'analyse nécessite l'utilisation de siRNA, les cellules sont transfectées selon le protocole décrit dans le paragraphe III.2.a et directement ensemencées à l'issue du temps de la transfection dans les puits après comptage.

X. Solutions et tampons

1- Expériences d'immuno-précipitation de la chromatine

Tampon de lyse: SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris/HCl 50 mM

Tampon de dilution: Triton X100 1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Tris/HCl 20 mM

Tampon TSEI: SDS 0,1%, Triton X100 1%, EDTA 2 mM, Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM

Tampon TSEII: SDS 0,1%, Triton X100 1%, EDTA 2 mM, Tris/HCl 20 mM, NaCl 500 mM

Tampon III: LiCl 250 mM, NP40 0,01%, Deoxycholate 25 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 10 mM

Tampon d'éluion: SDS 1%, NaHCO₃ 100 mM

2- Analyse d'expression protéique par Western Blot

Tampon de lyse RIPA : 25 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Deoxycholate, 0,1% SDS

Tampon de Laemmli 5X: 5%SDS, 1% β-mercaptoéthanol, 0,25 M Tris/HCl pH=6,5, 0 5% glycérol, 0,05% Bleu de bromophénol

Gel de concentration à 4,5%: 4,5% Acrylamide/Bisacrylamide, 75 mM Tris/HCl pH=6,8, 0,06%SDS, 0,03% persulfate d'ammonium, 0,01 ml TEMED

Gel de séparation à 12%: 12% Acrylamide/Bisacrylamide, 375 mM Tris/HCl pH=8,8 ; 0,01%SDS, 0,04% persulfate d'ammonium, 0,01 ml TEMED

Gel de séparation à 10%: 10% Acrylamide/Bisacrylamide, 375 mM Tris/HCl pH=8,8, 0,01%SDS, 0,04% persulfate d'ammonium, 0,01 ml TEMED

Tampon de migration: Tris 25 mM, Glycine 0,192 M, SDS 0,1%

Tampon de transfert: 48 mM Tris, 39 mM Glycine, 20% Méthanol

PBS Tween BSA: 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,1% Tween 20, BSA 5%, QSP PBS 1X

PBS NP-40: 0.1% NP-40, QSP PBS 1X

3- Expériences d'immuno-précipitation

Tampon de Lyse IP: 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 250 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 1% Triton X100, inhibiteur de protéases Complete (Roche) 1X final, 1 mM DTT

Tampon de dilution IP: 50 mM Tris/ HCl pH 7,4, 0,2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,4% Triton X100

4- Autres tampons et solutions

Rouge neutre: 0,5% (w/v) dans H₂O

Rouge ponceau: 2g rouge ponceau (Sigma), 30g de trichloroacétate, QSP 1l H₂O

L'équipe dans laquelle j'ai réalisé mon travail de thèse s'attache à préciser le rôle et le niveau d'implication des facteurs de transcription du groupe PEA3 (Pea3, Erm et Er81) lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse de la glande mammaire. Ce projet est réparti en deux grandes approches: l'étude de leur participation aux propriétés de prolifération de migration ou encore d'invasion impliqués lors de la morphogenèse comme de la tumorigenèse et la mise en évidence des mécanismes moléculaires utilisés. Dans ce contexte deux lignées cellulaires exprimant les membres du groupe PEA3 ont été choisies comme modèles d'étude:

- une lignée de cellules épithéliales mammaires murines « normales »: les **TAC** (TAC 2.1 dérivées des NMuMG ATCC CRL-1636). Ces cellules sont utilisées comme modèle de morphogenèse notamment suite à leur stimulation par des facteurs de croissance comme le HGF (Soriano *et al.*, 1995),
- une lignée de cellules épithéliales mammaires murines cancéreuses: les **MMT** (ATCC CCL-51), capables de former des tumeurs après injection dans des souris immunodéprimées.

La stratégie générale de ce projet est basée sur l'étude des propriétés morphogénétiques *in vitro* (comportement dans une matrice tridimensionnelle, migration, invasion, prolifération) et *in vivo* (injection dans des souris immunodéprimées) de ces cellules après surexpression, pour les cellules TAC, ou répression pour les cellules TAC et MMT, de l'expression de Pea3 ou Erm. Dans cette optique ont déjà été établis et caractérisés :

- des clones cellulaires TAC surexprimant de façon stable et constitutive Pea3 ou Erm et nommés respectivement **TAC Pea3-8** et **TAC Erm1** (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003),
- des petits ARN interférents (siRNA) nommés *sipea32DH* et *sierm3DH* permettant la répression de l'expression de Pea3 ou Erm dans les cellules MMT.

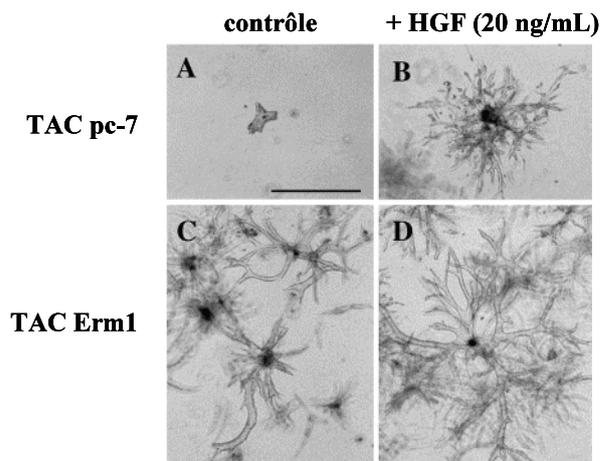


Figure 25. La surexpression des facteurs de transcription Pea3 et Erm dans les cellules « normales » (TAC) modifie leurs capacités morphogénétiques. La surexpression de Pea3 ou Erm (illustrée ici pour Erm) dans les cellules mammaires leur confère la capacité de faire de la morphogenèse de façon spontanée en gel tridimensionnel de collagène mimant ainsi l'effet du HGF (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

L'ensemble des résultats obtenus à partir de ces modèles a permis de montrer que la surexpression de Pea3 ou Erm dans les cellules épithéliales « normales » TAC leur confère la capacité de faire de la **morphogenèse** *in vitro*, mimant ainsi les effets du facteur de croissance HGF, alors que les cellules témoins en sont incapables (Figure 25). De plus il a été montré que ces capacités sont corrélées à l'acquisition de propriétés migratoires et invasives (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

Concernant le modèle de **tumorigenèse** MMT, la répression de l'expression de l'un ou l'autre des facteurs Pea3 ou Erm diminue la capacité des cellules à envahir une matrice tridimensionnelle de collagène. Cet effet est corrélé à une diminution des propriétés de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires. De plus, les cellules dans lesquelles l'expression de Pea3 ou Erm est inhibée forment des tumeurs de tailles réduites par rapport au contrôle lorsqu'elles sont injectées dans le flanc de souris immunodéprimées (Firlej, Ladam *et al.*, 2008).

Par conséquent, la somme des résultats obtenus à partir de ces modèles cellulaires TAC et MMT a permis de démontrer la participation des facteurs Pea3 et Erm dans les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires ; notamment dans les propriétés cellulaires modifiées lors de ces processus à savoir : la prolifération, la migration et l'invasion.

L'étape suivante de ce travail exploratoire a donc été basée sur la recherche des mécanismes moléculaires impliquant Pea3 et Erm lors de ces événements. L'objectif principal au sein de notre équipe s'est donc axé sur la recherche et la caractérisation des gènes cibles régulés par ces facteurs de transcription dans les modèles présentés précédemment complétés par les modèles de répression de ces facteurs dans les cellules TAC et d'autres modèles de surexpression mis en place au cours de ma thèse.

Dans cette optique, avant mon arrivée au laboratoire, une première approche non exhaustive de recherche des gènes cibles avait été réalisée en comparant les cellules TAC contrôles (TAC pc-7) *versus* surexprimant le facteur Erm (TAC Erm1) en utilisant une puce à ADN (AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays, Clontech) permettant de déterminer la modulation de l'expression de 388 gènes. Cette analyse comparative a permis d'identifier quelques cibles moléculaires comme le gène *bax* (Firlej *et al.*, 2005) ou encore le gène *cycline d2* dont l'étude de la régulation a été poursuivie.

A partir de l'ensemble de ces données et dans le but de poursuivre et de compléter les travaux dans ce contexte, mon travail de thèse s'est focalisé sur l'étude du facteur de transcription Pea3 et s'est orienté autour des axes de recherche suivants :

- 1 Compléter l'étude des propriétés morphogénétiques des cellules normales ou cancéreuses dans lesquelles l'expression du facteur Pea3 est modulée,
 - en analysant le comportement *in vivo* des cellules TAC Pea3-8 surexprimant Pea3,
 - en participant à l'étude des propriétés tumorales des cellules MMT dans lesquelles Pea3 est réprimé à l'aide de petits ARN interférents *sipea32DH*.
- 2 Rechercher les mécanismes moléculaires régulés par et relayant les effets de Pea3 en complétant une analyse transcriptomique globale et comparative à grande échelle dans les modèles cellulaires d'étude TAC *versus* TAC Pea3-8 et MMT *versus* MMT *sipea32DH*.
- 3 Poursuivre l'étude du gène *cycline D2* par la caractérisation de la régulation de son expression par le facteur Pea3 dans le modèle TAC.
- 4 Définir l'implication de la Cycline D2 et son lien fonctionnel avec Pea3 dans les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.
- 5 Exploiter les résultats des données issues de l'analyse transcriptomique réalisée sur les modèles TAC Pea3-8 et MMT *sipea32DH* et définir leur pertinence dans les effets induits par Pea3.

Pour l'ensemble de ces travaux, nous avons utilisé principalement les modèles cellulaires suivants: les TAC Pea3-8 surexprimant le facteur Pea3, les TAC *sipea32DH*, les TAC pLPCX Pea3 et TAC *sipea3pool* mises au point au cours de ma thèse, et les MMT *sipea32DH*. Nous disposons d'autres modèles déjà caractérisés pour les TAC ou les MMT et complémentaires de ceux-ci mais qui ne seront pas décrits ici afin de ne pas surcharger la présentation. Ces modèles, quand ils ont été utilisés, l'ont été dans le but d'avoir un témoin supplémentaire afin d'agrémenter la qualité des résultats.

I. Etablissement de modèles cellulaires TAC complémentaires aux modèles déjà établis

Cette première partie expose les modèles cellulaires mis au point au cours de ma thèse dans le but de compléter les études menées avec les modèles cellulaires TAC de surexpression TAC *Pea3-8* ou de répression TAC *sipea32DH* préalablement établis et dans un souci de disposer de plusieurs modèles à comparer.

Nous avons ainsi complété les modèles TAC:

- **de répression de *pea3* en utilisant un mélange de quatre nouvelles séquences siRNA dirigées contre *pea3***, commercialisés par la société Dharmacon et possédant deux caractéristiques nouvelles : une modification chimique augmentant la spécificité de prise en charge de chaque siRNA par la voie de dégradation des ARN messagers et leur association dans un mélange équimolaire nommé «pool» (*sipea3 pool*). L'application de ces critères doit permettre de diminuer les effets aspécifiques attribués à chaque siRNA. Lors de l'étude nous avons utilisé les siRNA *sipea32DH* et *sipea3pool* en parallèle.
- **de surexpression en établissant d'autres cellules TAC surexprimant de façon stable et constitutive le facteur de transcription *Pea3***. En effet l'utilisation de clones cellulaires possédant un même site d'intégration du plasmide d'expression au sein de leur génome peut entraîner des biais dans l'interprétation des résultats. Nous avons alors utilisé des outils rétroviraux permettant l'obtention d'une population de cellules ayant intégré de façon stable mais aléatoire un vecteur d'expression du facteur *Pea3*, au sein de leur génome. L'objectif est d'utiliser cette population de cellules en parallèle et en comparaison du clone cellulaire TAC *Pea3-8*.

1- Répression de l'expression de *Pea3* dans les cellules TAC

Suite à la transfection transitoire des siRNA dans les cellules TAC, la fonctionnalité des différentes séquences siRNA a été évaluée par analyse de la quantité d'ARN messager *pea3* par la technique de RT-PCR quantitative.

Quarante huit heures après la transfection des cellules le mélange *sipea3pool* permet une répression de l'ordre de 80% de l'expression de l'ARN messager *pea3* dans les cellules TAC (Figure 26). Cet effet est légèrement inférieur à celui observé après transfection du siRNA *sipea32DH* qui mène à une répression de l'ordre de 90% de l'expression de *Pea3* dans les mêmes cellules. Donc, même si les nouveaux siRNA utilisés semblent légèrement moins efficaces que le siRNA *sipea32DH* les résultats indiquent que les différentes séquences sont fonctionnelles.

Il est à noter que nous n'avons pas pu vérifier l'effet des siRNA sur l'expression de la protéine *Pea3* car ne nous disposons pas d'anticorps permettant la détection des protéines *Pea3* endogènes par les techniques de Western blot.

Ce modèle de répression a notamment été utilisé pour valider la régulation du gène *cycline d2* (cf paragraphe V.2). Il a aussi été utilisé en parallèle des TAC *sipea32DH* dans des études morphogénétiques qui ne seront pas détaillées ici faute d'avoir donné des résultats correctement exploitables.

2- Surexpression de *Pea3* dans les cellules TAC par l'utilisation de vecteurs rétroviraux

L'infection rétrovirale a été réalisée en suivant le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes. Les lignées cellulaires suivantes ont été obtenues:

- les cellules témoins nommées **TAC PLPCX** ayant intégré de façon stable le vecteur d'expression rétroviral PLPCX,

- les cellules **TAC PLPCX-Pea3-V5** ayant intégré de façon stable le vecteur d'expression rétroviral PLPCX-Pea3-V5 contenant la séquence d'ADN complémentaire du gène *pea3* étiqueté avec une séquence de type V5 (Invitrogen®).

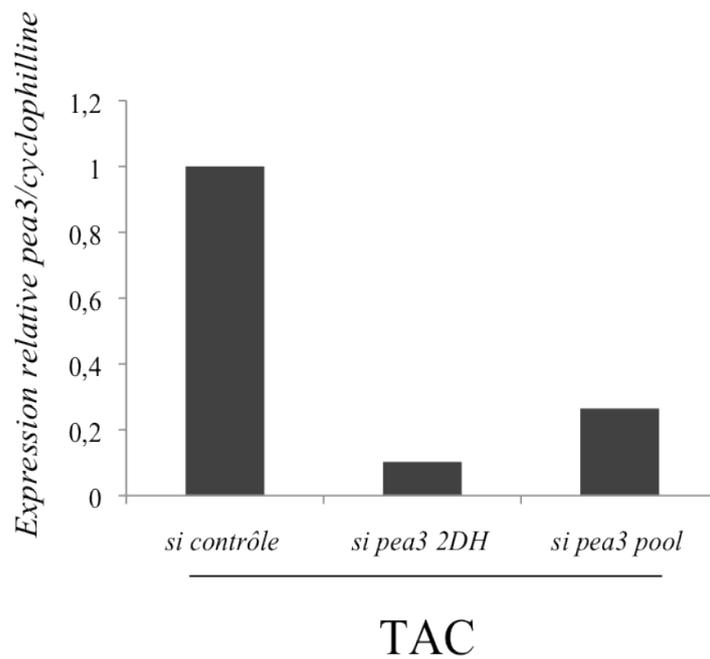


Figure 26. Répression de l'expression de *pea3* par interférence à l'ARN dans les cellules TAC. L'expression de l'ARN messager *pea3* a été analysée par RT-PCR quantitative, 48 heures après la transfection des siRNA *si contrôle*, siRNA *sipea32DH* et *sipea3pool* dans les cellules TAC. L'expression de *pea3* est normalisée par l'expression du gène référent *cyclophiline*.

a. Analyse morphologique des cellules en culture

La morphologie des cellules a été observée par microscopie optique dès le début de la sélection et jusqu'à l'obtention des nouvelles lignées ayant intégré les vecteurs PLPCX ou PLPCX Pea3. Ainsi, les cellules infectées par le vecteur contrôle PLPCX présentent une morphologie de cellules TAC sauvages. Dans la condition PLPCX Pea3-V5 nous avons observé un effet délétère se traduisant par la perte d'une grande quantité de cellules. Le maintien de la sélection pendant une semaine a permis d'obtenir des cellules que nous pouvons entretenir. Ces cellules possèdent une forme plus étirée que les cellules témoins TAC, TAC pc-7 ou TAC PLPCX, ressemblant à celle de cellules mésenchymateuses et à celle du clone cellulaire TAC Pea3-8 (Figure 27). Il est à noter que cet effet délétère n'a pu être observé que dans la condition de surexpression de Pea3 et cela à chaque infection virale que nous avons entreprise.

Nous avons alors voulu valider la surexpression de Pea3 dans les types cellulaires TAC PLPCX Pea3-V5, 48 heures après sélection (TAC PLPCX Pea3-V5 48H) et TAC PLPCX Pea3-V5 après une semaine de sélection (TAC PLPCX Pea3-V5) en les comparant aux clones cellulaires TAC Pea3-8 et TAC pc-7 pour lesquels nous avons plus d'expérience (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003), et cela de différentes façons :

- au niveau des ARN messagers par RT-PCR quantitative,
- au niveau protéique par Western Blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'étiquette V5,
- par analyse de l'expression de gènes cibles du facteur de transcription Pea3.

b. Analyse par RT-PCR quantitative

Nous avons entrepris de déterminer la quantité relative d'ARN messager *pea3*, par RT-PCR quantitative, dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5 après 48h ou une semaine de sélection, comparées aux cellules TAC PLPCX et aux clones cellulaires TAC Pea3-8 et TAC pc-7. Les cellules TAC Pea3-8 expriment 5 fois plus d'ARN messager *pea3* que les cellules TAC pc-7 (Figure 28A). Les cellules TAC PLPCX Pea3-V5-48H et TAC PLPCX

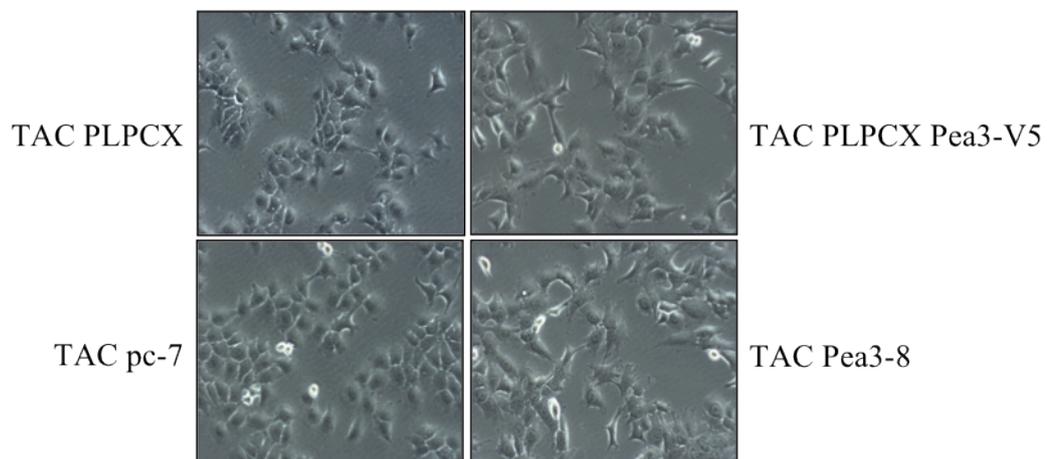


Figure 27. Observation de la morphologie des cellules TAC PLPCX et TAC PLPCX Pea3-V5 par microscopie optique et comparaison avec les modèles TAC pc-7 et TAC Pea3-8. Une semaine après le début de la sélection par ajout de l'antibiotique Puromycine®, les cellules TAC PLPCX Pea3-V5 tout comme les cellules TAC Pea3-8 ont une morphologie plus fibroblastique que les cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX. Grossissement X200.

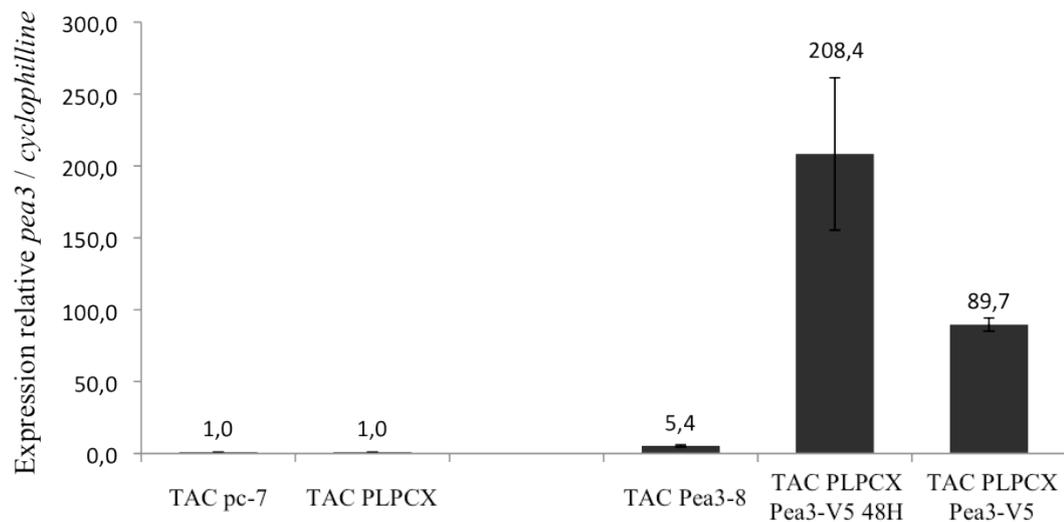
Pea3-V5 ont un niveau d'ARN messenger *pea3* respectivement 208 fois et 90 fois supérieur à celui observé dans les cellules témoins TAC PLPCX (Figure 28A). Ainsi une forte surexpression de l'ARN messenger *pea3* est associée à l'effet délétère observé suite à l'infection des cellules TAC et décrit précédemment alors que l'on observe une expression beaucoup plus restreinte dans les cellules échappant à cet effet délétère de Pea3 et possédant une morphologie « fibroblastique » (TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5).

c. Western Blot

Nous avons analysé l'expression des protéines Pea3 et Pea3-V5 dans les différents modèles cellulaires de surexpression de Pea3 en utilisant un anticorps reconnaissant la protéine Pea3 murine. Pour cela nous avons utilisé un anticorps polyclonal développé récemment et dirigé contre une séquence peptidique de la protéine Pea3 (Thermofisher, Openbiosystems). La validation de la fonctionnalité de cet anticorps préalablement effectuée, a indiqué qu'il ne permettait de détecter la protéine Pea3 par Western blot que lorsque celle-ci est surexprimée de façon transitoire, les cellules HEK293 qui présentent un bon taux de transfection ayant été choisies pour les différentes expériences qui ont été menées (Figure 28B). La détection de Pea3-V5 a donc été testée dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5-48H et TAC PLPCX Pea3-V5 en utilisant cet anticorps. Par cette méthode nous sommes en mesure de détecter un signal spécifique à 80KDa environ dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5-48H, signal non détecté dans les cellules TAC PLPCX et pouvant correspondre à la protéine Pea3-V5 (Figure 28B). En parallèle, nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression de Pea3-V5 dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5 ni celle de Pea3 dans les cellules TAC Pea3-8 comparées aux cellules TAC pc-7. Il est à noter que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'étiquette V5 n'a pas non plus permis la détection de Pea3-V5 dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5.

L'ensemble de ces données montre donc que la protéine Pea3-V5 est bien traduite dans les cellules mais ne nous permettent pas de vérifier la surexpression de Pea3 au niveau protéique dans les cellules TAC Pea3-8 ni celle de Pea3-V5 dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5. Cependant nous pouvons penser que si cette surexpression existe, elle est inférieure à celle observée dans le modèle cellulaire TAC PLPCX Pea3-V5 48H, ce qui peut être corrélé aux données de RT-PCR quantitative.

A.



B.

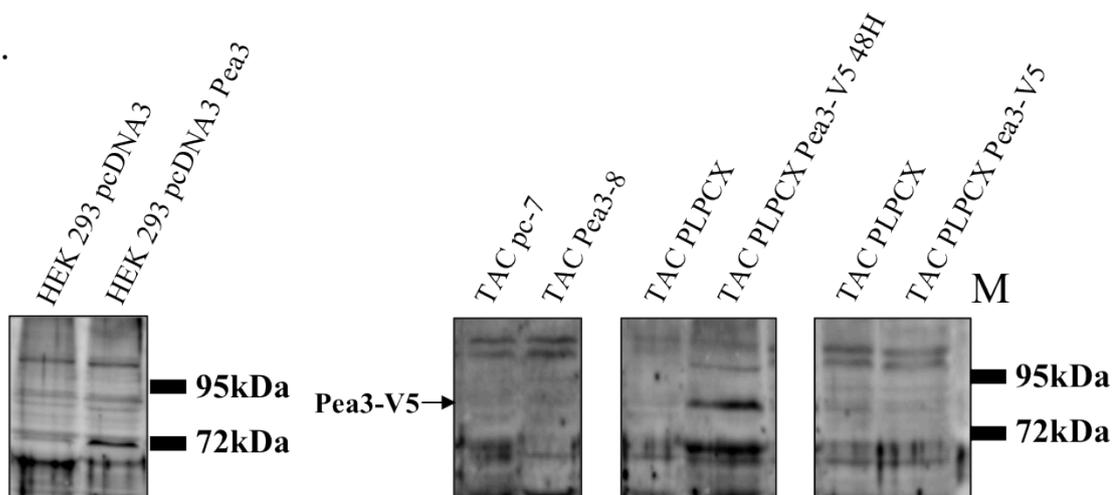


Figure 28. Analyse de l'expression de Pea3 au niveau transcriptionnel et protéique dans les modèles cellulaires TAC de surexpression de Pea3. **A.** Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression de l'ARN messenger *pea3* dans les cellules TAC Pea3-8, TAC PLPCX Pea3-V5 48H et TAC PLPCX Pea3-V5 par rapport aux cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX dont l'expression est arbitrairement fixée à 1. **B.** Analyse par Western Blot de l'expression de Pea3 et Pea3-V5 en utilisant un anticorps polyclonal permettant la détection de la protéine Pea3 murine dans les cellules HEK 293 après transfection transitoire d'un plasmide permettant l'expression de Pea3, ainsi que dans les modèles TAC de surexpression stable de Pea3.

Ces résultats indiquent qu'au cours de la sélection des cellules exprimant Pea3-V5 l'apparition de populations cellulaires exprimant faiblement le facteur de transcription Pea3 a été favorisée. Une forte expression de Pea3 semble donc avoir un effet délétère sur les cellules TAC en culture.

Puisque nous n'avons pas été en mesure de visualiser la surexpression de Pea3 ou Pea3-V5, nous avons complété l'analyse par un test de la fonctionnalité de Pea3 en mesurant, par RT-PCR semi quantitative, l'expression de gènes cibles de Pea3 dont la modulation a déjà pu être observée dans les modèles cellulaires MMT et TAC Pea3-8 ainsi que dans la littérature. En effet, une surexpression effective de Pea3 devrait favoriser l'expression de ces gènes cibles.

d. Analyse des gènes cibles par RT-PCR semi quantitative

En nous basant sur nos données préliminaires et sur la littérature nous avons choisi d'analyser l'expression des gènes *mmp13* et *mmp9* par RT-PCR semi quantitative dans les cellules TAC pc-7, TAC PLPCX, TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5. En effet ces deux gènes sont caractérisés comme gènes cibles directs du facteur de transcription Pea3 dans la littérature et au laboratoire (Diaz-Sanjuan *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2008), données non publiées). Lors d'expériences préliminaires nous avons pu montrer que leur expression est augmentée dans les cellules TAC Pea3-8. Les gènes *36b4* et *ppia* ont été utilisés comme gènes référents. Ainsi, l'expression des gènes *mmp13* et *mmp9* est augmentée dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5 comparées aux cellules TAC PLPCX (Figure 29). Ces résultats sont similaires à ceux observés dans les cellules TAC Pea3-8 comparées aux cellules TAC pc-7. L'ensemble de ces données indique que la protéine Pea3-V5 est fonctionnelle dans la lignée TAC puisqu'elle module l'expression de gènes cibles de Pea3.

Malgré un niveau plus important d'ARN messager *pea3* dans les TAC PLPCX Pea3-V5 que dans les TAC Pea3-8 la modulation observée pour les gènes testés y est plus faible que dans les TAC Pea3-8. Ceci indique probablement une plus faible activité ou expression de la protéine Pea3-V5 que la forme sauvage de Pea3 surexprimée dans le modèle TAC Pea3-8.

L'établissement de ces autres lignées TAC surexprimant Pea3 de façon constitutive ayant été obtenues assez récemment, elle n'ont pu être incluses systématiquement en parallèle des TAC Pea3-8. Cependant ces modèles qui complètent notre gamme d'outils, apportent de nouvelles informations concernant l'importance des effets de la surexpression de Pea3 dans la capacité des cellules à le supporter et ouvrent aussi de nouvelles voies d'investigation potentielles.

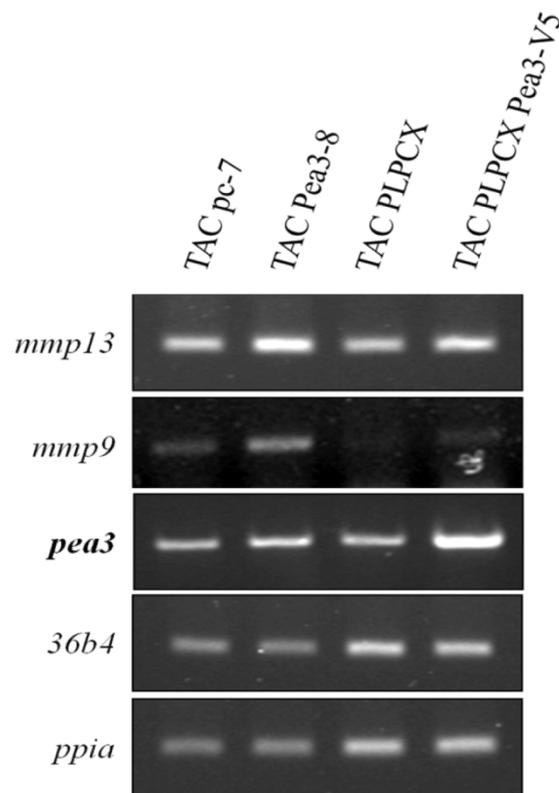


Figure 29. Analyse de l'expression des gènes cibles de Pea3 *mmp13* et *mmp9* dans les modèles cellulaires de surexpression de Pea3. L'expression des gènes *mmp13*, *mmp9* et *pea3* a été analysée par RT-PCR semi-quantitative dans les cellules TAC pc-7, TAC Pea3-8, TAC PLPCX et TAC PLPCX Pea3-V5. L'expression des gènes *36b4* et *ppia* est utilisée en tant que référent.

II. Pea3 est un facteur pro-morphogène capable de conférer des propriétés tumorales aux cellules épithéliales mammaires normales

Après avoir mis en évidence que les cellules surexprimant Pea3, les TAC Pea3-8, sont capables de faire de la morphogénèse de façon spontanée *in vitro* en gel de collagène, et qu'elles ont des propriétés de migration et d'invasion augmentées (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003), nous avons émis l'hypothèse que Pea3 puisse induire la formation d'un arbre épithélial après implantation des cellules dans une glande mammaire préalablement désépithélialisée. Nous avons donc essayé de mettre au point cette technique dans le but de tester les cellules TAC Pea3-8 dans ce contexte.

1- Essais de reconstitution d'une glande mammaire désépithélialisée

Cette technique *in vivo* est basée sur l'élimination de l'épithélium des glandes mammaires à un stade pubertaire précoce de façon à pouvoir réimplanter des cellules (normales ou à génotype modifié) dans le 'Fat Pad free' c'est à dire dans l'environnement mésenchymateux, pour recréer un contexte « naturel ». Après un certain nombre d'essais et de mise au point, cette technique nous a permis d'obtenir des glandes mammaires désépithélialisées. Mais cependant, pour l'instant, le système n'est pas fonctionnel dans le cadre de la ré-épithélialisation car nous n'avons pas de garantie dans les essais qui ont été effectués que les cellules qui repartent, dans les cas où cela est arrivé, sont bien des cellules que nous avons injectées. Pour cela l'obtention de cellules TAC pc-7 et TAC Pea3-8 exprimant la protéine GFP est actuellement en cours.

2- Les cellules TAC Pea3-8 possèdent des propriétés de cellules transformées

Lors d'un essai de recolonisation mammaire, l'injection de 500 000 cellules TAC Pea3-8 a conduit à l'obtention de tumeurs alors qu'aucune observation ne fût faite dans les glandes greffées avec les cellules TAC pc-7. Nous avons alors voulu reproduire l'expérience afin de vérifier l'exactitude de ces résultats.

Pour cela, nous avons injecté les cellules TAC Pea3-8 ou pc-7 dans la glande mammaire numéro 4 gauche non désépithélialisée de souris immuno-déficientes SCID. 12

souris ont été injectées avec les cellules TAC pc-7 et 12 avec les cellules TAC Pea3-8, le tout réparti sur trois expériences indépendantes.

Le suivi des animaux a été réalisé par palpation de la glande injectée, tous les 7 jours environ afin de détecter l'apparition de masses tumorales. L'évolution du volume médian des tumeurs en fonction du temps est représentée pour chaque expérience (Figure 30).

Dans deux des expériences menées, les cellules TAC pc-7 n'ont pas formé de tumeurs pendant le temps d'observation (Figures 30A et 30B). Dans la troisième expérience, 3 souris sur 4 injectées avec les TAC pc-7 ont développé des tumeurs détectables à partir de 137 jours, mais avec une évolution très lente (Figure 30C). Concernant les cellules TAC Pea3-8, 11 souris sur les 12 injectées au total ont développé des tumeurs détectables à partir de 74, 77 ou 84 jours en fonction de l'expérience et qui ont progressé constamment dans le temps jusqu'au sacrifice des animaux (Figures 30A, 30B et 30C).

L'observation macroscopique des organes a permis de mettre en évidence la présence de métastases au niveau des poumons des souris ayant développé des tumeurs suite à l'injection des cellules TAC Pea3-8 alors qu'aucune anomalie n'a pu être observée dans les organes des souris témoins ayant développé ou non des tumeurs (Figure 31A). L'observation microscopique des poumons après inclusion dans la paraffine confirme la présence de masses cellulaires désorganisées correspondant à des métastases au sein du tissu pulmonaire (Figure 31B).

L'ensemble de ces données indique un potentiel tumorigène très faible pour les cellules témoins TAC pc-7. Le fait que cette capacité ne soit observée que dans une seule expérience sur les trois peut être le reflet d'une erreur technique. Il faudra répéter l'expérience pour tirer une conclusion définitive. Néanmoins, nous pouvons affirmer que la surexpression du facteur de transcription Pea3 favorise considérablement la formation de tumeurs en augmentant la fréquence et en diminuant le délai d'apparition. Pea3 confère aussi à ces cellules la capacité de former des métastases au niveau des poumons.

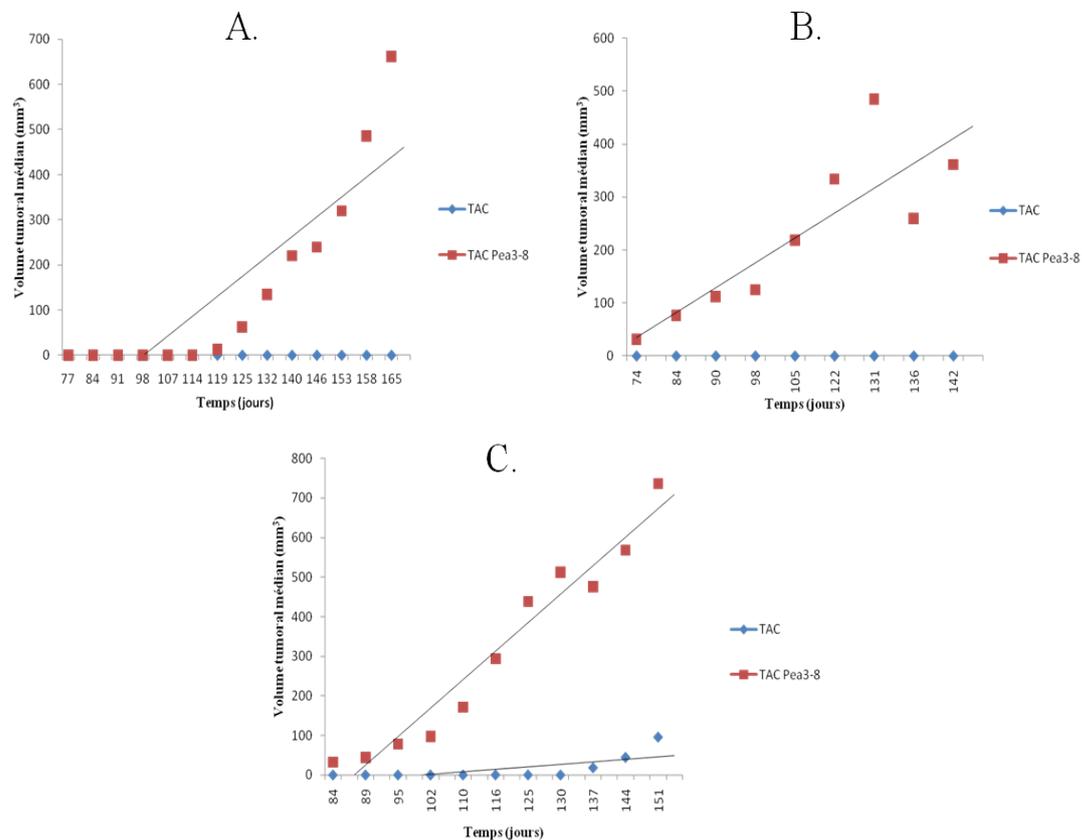


Figure 30. Analyse du potentiel tumoral des clones cellulaires TAC pc-7 et TAC Pea3-8 après injection dans une glande mammaire désépithérialisée de souris immunodéficientes. (A, B, C) Trois expériences indépendantes pour lesquelles est représentée la valeur médiane du volume tumoral mesuré dans chaque condition TAC pc-7 ou TAC Pea3-8 en fonction du temps. Le temps le plus précoce correspond à la première observation tumorale.

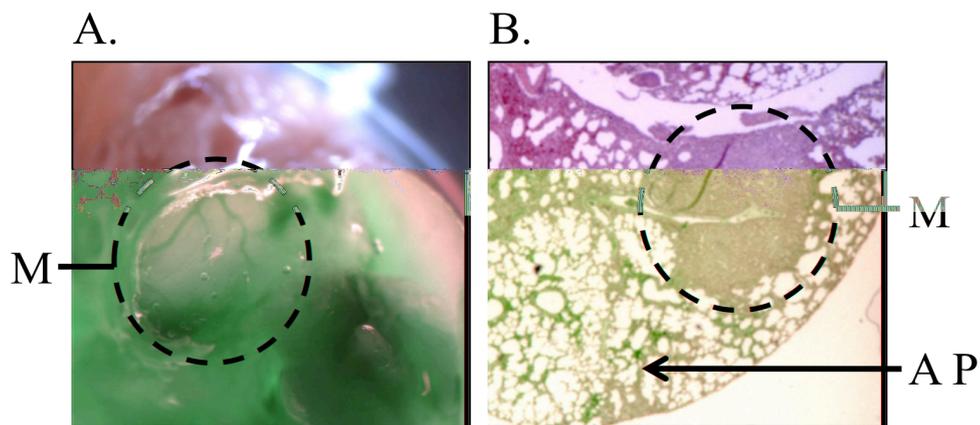


Figure 31. Analyse de la présence de métastases au niveau des poumons des souris injectées avec les cellules TAC Pea3-8. A. Observation macroscopique d'une métastase se développant dans le poumon d'une souris dans laquelle les cellules TAC PEA3-8 ont été injectées. B. Observation microscopique d'une métastase au sein du tissu pulmonaire dans lequel s'est développée une métastase. M (Métastase), AP (Alvéoles Pulmonaires).

Ces résultats renseignent sur l'implication de Pea3 dans l'acquisition, par les cellules mammaires TAC, de propriétés cancéreuses lorsqu'elles sont placées dans le contexte de la glande mammaire *in vivo* et sont en accord avec les données obtenues dans le modèle de cellules cancéreuses mammaires, les cellules MMT, qui sont présentées dans le paragraphe suivant. Le travail *in vivo* a été réalisé avec l'aide de Patrick Dumont, Institut de Biologie de Lille.

III. Pea3 est un facteur pro-tumoral capable de moduler les propriétés tumorales des cellules épithéliales mammaires transformées

L'implication des facteurs de transcription du groupe PEA3 lors du développement tumoral est décrite dans la littérature et ceci dans divers types de tissus dont la glande mammaire (cf partie Introduction, V). Cependant au début de cette étude, les propriétés cellulaires et les mécanismes moléculaires régulés par ces facteurs dans le contexte de la tumorigenèse mammaire étaient encore peu étudiés. De plus toutes les données disponibles préalablement à nos travaux étaient issues d'expériences basées sur des stratégies de surexpression et ne permettaient donc pas d'apprécier l'importance de leur présence dans ce contexte. Enfin, très peu de gènes cibles des membres du groupe PEA3 étaient décrits lors de la progression du cancer mammaire.

En se basant sur ce constat, une stratégie de répression de l'expression de Pea3 a été envisagée dans des cellules cancéreuses mammaires MMT, cellules possédant de hauts pouvoirs de prolifération, de migration et d'invasion, ainsi que la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles injectées dans le flanc de souris immunodéprimées. Puis les questions suivantes ont été abordées :

Quelle est l'influence de la répression de l'expression de Pea3 sur les propriétés morphogénétiques des cellules MMT ?

Quels sont les gènes cibles dont l'expression est régulée suite à cette répression de Pea3 ?

Lors de mon arrivée au laboratoire j'ai participé à l'obtention des résultats de cette étude qui ont permis la publication d'un article scientifique, notamment pour la réalisation des analyses phénotypiques et pour l'analyse des gènes cibles:

Firlej V*, **Ladam F***, Brysbaert G, Dumont P, Fuks F, de Launoit Y, Benecke A, Chotteau-Lelièvre A (2008). **Reduced tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3 or Erm dependent transcription.**

Journal of Cell Science 121: 3393-402. * **Contributed equally to the work**

J'ai choisi de résumer ici les travaux concernant le facteur de transcription Pea3, membre du groupe PEA3 sur lequel je me suis focalisé pendant ma thèse. Les figures référencées dans le texte sont disponibles dans l'article attaché ci après. De plus je ne présenterai dans cette partie que les résultats concernant l'effet de la répression de Pea3 sur les propriétés morphogénétiques des cellules MMT. L'aspect recherche des gènes cibles sera développé plus loin, dans la partie IV.2.b.

Résumé de l'article

Afin de mieux comprendre comment Pea3 est impliqué dans la progression des cancers de la glande mammaire, l'influence de sa répression sur les capacités de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires a été analysée. En effet, de nombreux gènes participant à la tumorigenèse régulent ces trois propriétés cellulaires, permettant ainsi la croissance de la tumeur ainsi que la formation de métastases. Cette analyse a été entreprise par des tests *in vitro* en comparant des cellules MMT transfectées avec des séquences siRNA témoins à celles transfectées avec des siRNA ciblant l'ARN messager *pea3*, le *sipea32DH* décrit dans la partie I ou le *sipea34DH* (un autre siRNA utilisé à ce moment là).

La prolifération des cellules a été étudiée par comptage toutes les 24 heures pendant 96 heures. Ainsi, la répression de Pea3 entraîne une diminution de la prolifération des cellules d'environ 40% après 96 heures d'expérience (Figure 2.A. de l'article).

La migration des cellules MMT a été analysée en testant leur capacité à traverser une membrane microporée. Par cette méthode nous avons alors observé une diminution de l'ordre de 80 à 90% de leur capacité à traverser la membrane lorsque l'expression de Pea3 est réprimée (Figure 2C de l'article).

Le potentiel invasif a quant à lui été mesuré en plaçant les cellules dans un gel tridimensionnel de collagène. En effet, les cellules MMT peuvent envahir le gel formant ainsi des travées de cellules progressant dans le collagène. La répression de Pea3 dans ces cellules diminue fortement la formation de ces travées indiquant alors que les cellules sont moins invasives (Figure 3 de l'article).

En conclusion, les tests morphogénétiques *in vitro* indiquent que le facteur de transcription Pea3 est important pour les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion des cellules MMT.

Compte tenu des résultats de ces analyses *in vitro* ainsi que du fait que les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion participent à l'établissement du potentiel tumoral et à la progression des tumeurs, nous avons voulu déterminer quel serait l'impact de la répression de Pea3 sur la capacité des cellules MMT à former des tumeurs.

Pour ce faire des cellules MMT exprimant de façon stable et constitutive des séquences shRNA témoins ou permettant la répression de façon spécifique de l'expression de Pea3 ont été développées. Après injection des cellules dans le flanc de souris immunodéprimées, l'apparition et la croissance des tumeurs a été suivie. Ce suivi montre que les cellules MMT témoins et celles dans lesquelles l'expression de Pea3 est réprimée forment des tumeurs détectables trois à quatre jours après injection. Cependant après neuf jours, les tumeurs issues des cellules MMT exprimant la séquence shRNA ciblant Pea3 sont environ deux fois plus petites que celles formées par les cellules témoins. Ceci indique donc un retard de croissance de la tumeur lorsque l'expression de Pea3 est réprimée (Figure 4 de l'article).

La somme de ces résultats a permis de conclure que le facteur de transcription Pea3 régulait la progression tumorale *in vivo* et ceci, notamment, en contrôlant les capacités de prolifération, de migration et d'invasion des cellules MMT.

L'analyse transcriptomique qui est présentée dans l'article et qui sera reprise dans le paragraphe IV.2.b. est en accord avec l'ensemble de ces données phénotypiques. En effet de nombreux gènes dont l'expression est modulée suite à l'inhibition de l'expression de *Pea3* sont décrits pour influencer les capacités de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires. Parmi ceux-ci se trouve le gène *cycline d2* dont l'étude fait l'objet de la partie suivante de mon manuscrit de thèse.

IV. Quelles sont les mécanismes moléculaires relayant Pea3 dans ses effets pro-morphogènes et pro-tumorigènes ?

Compte tenu des effets observés lors de la modulation de l'expression de Pea3 dans nos modèles d'étude TAC et MMT, nous nous sommes interrogés sur la façon dont Pea3 pouvait agir au niveau moléculaire. Pour cela la recherche des gènes dont l'expression est modulée suite à la surexpression de Pea3 dans le modèle TAC et suite à l'inhibition de son expression dans le modèle MMT a été entreprise par différentes études transcriptomiques comparatives que je vais détailler dans cette partie du manuscrit.

1- Les connaissances à mon arrivée au laboratoire

Des expériences menées avant mon arrivée dans le laboratoire et ayant eu pour base l'utilisation d'une puce à ADN (AtlasTM Mouse cDNA Expression Arrays, Clontech) et la comparaison du transcriptome des cellules TAC Erm1 et TAC pc-7, ont permis de définir huit gènes régulés de façon importante par Erm : *bax*, *gadd 45*, *gadd 153*, *faf1*, *cycline D2*, *p55^{cdc}*, *pim-1* et *NFkB*. Cette étude a été initiée suite à la mise en évidence des propriétés morphogènes des facteurs Pea3 et Erm. Un choix ayant du être fait à l'époque, ce sont les cellules TAC Erm 1 qui ont été choisies.

Le travail a été poursuivi pour les gènes *bax* et *cycline D2* pour lesquels la caractérisation de la régulation par les facteurs du groupe PEA3 a été entreprise. Le gène *bax* code une protéine pro-apoptotique régulant la sortie du cytochrome C des mitochondries (Grimm and Brdiczka, 2007). Aucun lien n'ayant été établi entre les mécanismes de régulation de l'apoptose et les membres du groupe PEA3, l'étude de la régulation du gène *bax* a été réalisée et publiée dans The Journal of Biological Chemistry (Firlej *et al.*, 2005). Le gène *cycline d2* quant à lui, est un acteur de la progression du cycle cellulaire. L'analyse du transcriptome des cellules TAC Erm1 et des cellules MMT montre que son expression est positivement régulée par Erm (Firlej *et al.*, 2005; Firlej, Ladam *et al.*, 2008). La progression du cycle cellulaire étant un événement primordial pour la prolifération des

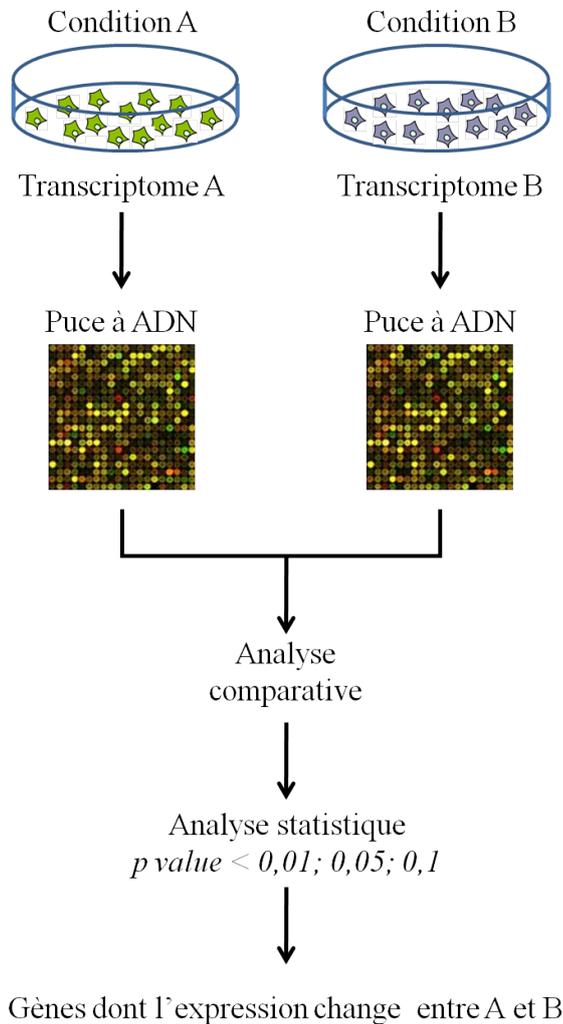


Figure 32. Représentation schématique de la stratégie d'analyse comparative du transcriptome des modèles cellulaires de surexpression et d'inhibition de l'expression de Pea3. Les ARN messagers des cellules de deux conditions à comparer sont récupérés, marqués et hybridés sur des puces à ADN contenant des séquences oligonucléotidiques. En fonction du nombre de copies d'un même ARN messager le signal mesuré sera plus ou moins important ce qui permet de quantifier l'expression de chaque ARN messager. La comparaison du niveau d'expression de chaque ARN messager entre les deux conditions et l'analyse statistique des données permet de déterminer quels sont les gènes dont l'expression est modulée entre la condition A (TAC pc-7 ou MMT si contrôle) et la condition B (TAC Pea3-8 ou MMT *sipea3 2DH*).

cellules en contexte normal et pathologique, l'étude de la régulation de l'expression du gène *cycline d2* par les membres du groupe PEA3 et de son implication dans les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires a donc été entreprise. Cette étude initiée avant mon arrivée a ensuite fait l'objet d'une partie de mon travail de thèse en focalisant sur le facteur Pea3 et sera détaillée dans les paragraphes V et VI.

2- Les nouvelles analyses transcriptomiques réalisées au cours de ma thèse

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires régulés par Pea3 dans nos différents modèles cellulaires d'étude TAC et MMT, nous avons entrepris une série d'analyses transcriptomiques utilisant la technologie des puces à ADN. La stratégie est basée sur une analyse comparative du transcriptome des cellules TAC ou MMT dans lesquelles l'expression de Pea3 est modulée (TAC Pea3-8 ou MMT *sipea32DH*) par rapport au transcriptome des cellules TAC ou MMT témoins (TAC pc-7 ou MMT si contrôle). Cette façon de procéder permet de déterminer les gènes dont l'expression est modulée suite à la surexpression de Pea3 dans les TAC ou suite à l'inhibition de Pea3 dans les cellules MMT et est résumée dans la Figure 32. Nous avons choisi, pour analyser le transcriptome des cellules, d'utiliser des puces à ADN de la technologie Applied Biosystems, Mouse Genome Survey Microarray, qui permet d'analyser l'expression de 28218 gènes validés du génome murin. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Arndt Benecke et son équipe (IRI, systems epigenomics group), notamment pour l'analyse statistique des données.

Pour cette étude, les ARN ont été extraits des modèles de surexpression et de répression suivants:

- les cellules TAC pc-7 (3 échantillons)
 - les cellules TAC Pea3-8 (3 échantillons)
- modèles réalisés dans le cadre de mon travail de thèse.*
- Les cellules MMT transfectées avec un siRNA contrôle (3 échantillons)
 - les cellules MMT transfectées avec le siRNA *si pea32DH* (3 échantillons)

modèles mis en place préalablement à ma thèse.

Pour chaque échantillon, la qualité et la pureté des ARN a été vérifiée par la technologie des puces Agilent®, puis les ARN ont été amplifiés et marqués à la digoxigénine. Les ARN ont alors été fragmentés et hybridés pendant 18 heures sur des

puces à ADN reconstituant le génome murin. Après révélation, les résultats ont été analysés grâce au logiciel Biosystems Expression Array System Software et le logiciel ace.map par l'équipe du Dr Arndt Benecke (comme décrit dans la partie Matériel et méthodes). Chaque échantillon TAC Pea3-8 ou MMT *si pea32 DH* est respectivement comparé individuellement à chaque échantillon TAC pc-7 ou MMT siRNA contrôle. Ces analyses ont permis de mettre en évidence une variation de l'expression de certains gènes entre les différentes conditions testées. Nous avons choisi de ressortir de cette analyse les gènes dont l'expression est régulée de plus ou moins deux fois et ayant une valeur $p < 0,01$, c'est-à-dire dont la probabilité d'être régulée est de 99%. Il est à noter que la valeur p peut être modulée en fonction des résultats obtenus. En effet, plus elle sera haute (par exemple $p < 0,05$ ou 0,1) plus le nombre de gènes qui ressortira de l'analyse sera important. Nous verrons qu'il peut être intéressant de faire varier ce paramètre.

Ainsi en suivant ces critères nous obtenons une liste de 115 gènes régulés suite à la surexpression de Pea3 dans le modèle TAC (TAC pc-7 *versus* TAC Pea3-8) et une liste de 84 gènes dont l'expression est modulée suite à l'inhibition de Pea3 dans les cellules MMT (MMT siRNA contrôle *versus* MMT *si pea32 DH*). Nous avons choisi de présenter, dans les tableaux 3 et 4, les données pour les 10 gènes les plus régulés, en positif et en négatif, dans les deux analyses: l'expression relative représente l'expression des gènes dans les cellules contrôles (TAC pc-7 ou MMT siRNA contrôle) par rapport à celles dans lesquelles l'expression de Pea3 est modulée (TAC Pea3-8 ou MMT siRNA *pea3 2DH*).

a. Analyse des gènes régulés par Pea3 dans les cellules TAC

L'analyse de la liste des gènes régulés par la surexpression du facteur Pea3 permet, en fonction des connaissances quant à leur rôle décrit dans la littérature, de faire ressortir les catégories suivantes:

- des gènes participant aux propriétés de **migration et d'invasion** cellulaires comme les gènes *mmp13*, *serpine2*, *1110006o71Rik*, *2010111101Rik (ap-o)*, *cxcl5*, *Tm4sf1*,
- des gènes impliqués dans le contrôle du **métabolisme cellulaire** comme les gènes *cidec*, *hpxn*, *ugt2b36*, *dio3*,

gène	geneID	Expression relative TAC Pea3-8 / TAC pc-7	P	Nom complet du gène	Fonction
<i>cidec</i>	843553	19,07	0,0008	cell death-inducing DFFA-like effector c	code une protéine induisant l'apoptose et impliquée dans le métabolisme et le stockage des lipides
<i>mmp13</i>	837391	18,12	0,0014	matrix metallopeptidase 13	code une enzyme dégradant la matrice extracellulaire et régulant le potentiel invasif des cellules
<i>v1rc25</i>	769038	17,85	0,0042	vomeronasal 1 receptor, C25	ND
<i>ctla2a</i>	920918	15,58	0,0063	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	ND
<i>serpine2</i>	554463	13,80	0,0027	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2	code une protéine contrôlant la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion cellulaire
<i>4930486L24 Rik</i>	756559	10,69	0	RIKEN cDNA 4930486L24 gene	correspond au gène <i>testin</i> , gène suppresseur de tumeurs
<i>ly6c</i>	460369	10,27	0,0014	lymphocyte antigen 6 complex, locus C	protéine impliquée dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose des lymphocytes T
<i>krt1-23</i>	753061	9,04	0	keratin complex 1, acidic, gene 23	ND
<i>1110006O17 Rik</i>	337868	8,07	0,0007	RIKEN cDNA 1110006O17 gene	correspond au gène <i>ecscr</i> qui code un récepteur membranaire impliqué dans la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse
<i>AU040829</i>	580857	7,00	0,0075	expressed sequence AU040829	correspond au gène <i>rich2</i> qui code une protéine impliquée dans l'organisation du réseau d'actine des cellules épithéliales polarisées
<i>2010111I01 Rik</i>	649871	0,20	0,0078	RIKEN cDNA 2010111I01 gene	correspond au gène <i>ap-o</i> qui code une métalloprotéase
<i>cxcl5</i>	395074	0,19	0,0017	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	code une protéine impliquée dans la régulation de la migration, de la prolifération et de la chemoattraction des cellules immunitaires
<i>akr1c19</i>	727935	0,17	0	aldo-keto reductase family 1, member C19	ND
<i>hpxn</i>	928802	0,17	0,0001	hemopexin	code une protéine impliquée dans le transport et la dégradation de l'hème
<i>null</i>	503177	0,17	0,0001	null	ND
<i>ugt2b36</i>	490672	0,16	0,0038	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B36	code une enzyme responsable de la glucuronidation et de la dégradation des hormones stéroïdiennes (estrogène et androgène)
<i>dio3</i>	568711	0,11	0,0057	deiodinase, iodothyronine type III	code une enzyme impliquée dans la dégradation des hormones thyroïdiennes
<i>cdkn2b</i>	807657	0,07	0,0002	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	code une protéine inhibitrice des CDK4 et 6 régulant la progression de la phase G1 du cycle cellulaire
<i>xist</i>	653772	0,05	0,0074	inactive X specific transcripts	gène produisant un ARN non codant responsable de l'inactivation de l'un des deux chromosomes X chez la femme
<i>tm4sf1</i>	343697	0,04	0,0007	transmembrane 4 superfamily member 1	code une protéine régulant l'angiogenèse et la migration des cellules

Tableau 3. Noms et fonctions de gènes dont l'expression est régulée dans les cellules TAC surexprimant Pea3 (TAC Pea3-8). L'expression relative (colonne verte) représente l'expression des gènes dans les cellules TAC Pea3-8 par rapport aux cellules TAC pc-7. Le tableau répertorie aussi les noms et symboles des gènes, leur valeur p (P) ainsi que leur numéro d'identification dans les puces à ADN (gene ID) et des exemples de leurs fonctions décrites dans la littérature.

- des gènes contrôlant la **prolifération** et la **progression du cycle cellulaire** comme les gènes *ly6c* et *cdkn2b*,
- des gènes régulant l'**apoptose** comme les gènes *cidec* et *ly6c*.

Ces différentes catégories de gènes sont d'un intérêt majeur lors du développement de la glande mammaire mais aussi lors des cancers et cela permet de suggérer qu'ils sont en adéquation avec les rôles décrits pour Pea3 lors de ces événements (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003; Firlej, Ladam *et al.*, 2008; Hakuma *et al.*, 2005; Kaya *et al.*, 1996; Kurpios *et al.*, 2009).

Enfin dans le but de valider ces résultats, obtenus par interprétation des données de puces à ADN, nous avons entrepris de vérifier la modulation de l'expression des gènes *cidec* et *mmp13* dont l'expression est augmentée dans les cellules TAC Pea3-8 par rapport aux cellules TAC pc-7 et du gène *cdkn2b* dont l'expression semble réprimée par Pea3. Pour ce faire l'expression de ces gènes a été étudiée par une technique de RT-PCR semi quantitative dans les modèles cellulaires TAC pc-7 *versus* TAC Pea3-8 et cette analyse a été étendue aux modèles TAC PLCPX et TAC PLCPX Pea3-V5. Ainsi l'expression des gènes *mmp13* et *cidec* dans les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLCPX Pea3-V5 est augmentée par rapport à celle observée dans les cellules TAC pc-7. L'expression du gène *cdkn2b* est réprimée dans les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLCPX Pea3-V5 par rapport à leurs contrôles respectifs. Ces données sont donc en accord avec celles obtenues dans les expériences de puces à ADN pour le modèle TAC Pea3-8 et sont confortées par l'analyse dans le modèle TAC PLCPX Pea3-V5 (Figure 33).

b. Analyse des gènes régulés par Pea3 dans les cellules MMT

L'analyse des gènes régulés par le facteur de transcription Pea3 dans le modèle cellulaire MMT, réalisée selon le même concept que ce qui a été présenté ci-dessus pour les cellules TAC, a fait l'objet de la publication (Firlej, Ladam *et al.*, 2008), et est résumée dans le Tableau 4 pour les 10 gènes les plus régulés, en positif et en négatif. La validation de la pertinence de l'analyse transcritomique a été réalisée par le test de quelques gènes cibles présentant un niveau de régulation différent dans les expériences de puces à ADN (plus ou moins fortement régulés et en positif ou en négatif) par RT-PCR semi quantitative (cf Figure 6 de l'article).

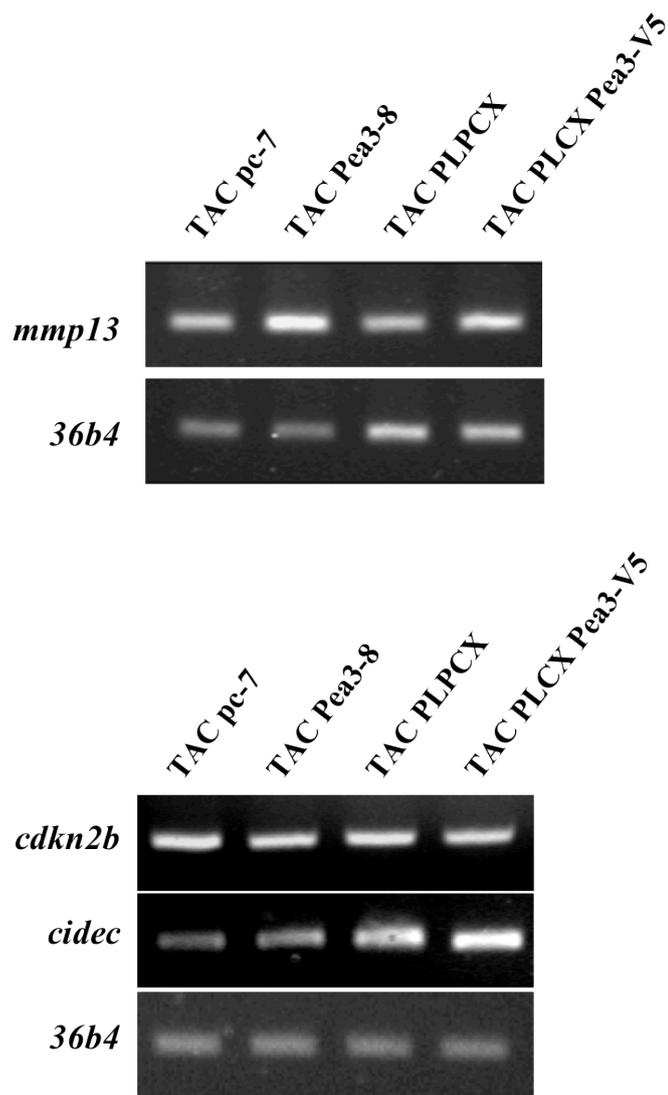


Figure 33. Validation par RT-PCR semi quantitative de l'expression de trois gènes identifiés lors de l'analyse du transcriptome des cellules TAC Pea3-8 versus TAC pc-7. L'expression des gènes *mmp13*, *cdkn2b* et *cidec* a été analysée par RT-PCR semi quantitative dans les modèles cellulaires TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 en comparaison des cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX. L'expression du gène *36b4* est utilisée en tant que référent.

gène	geneID	Expression relative siRNA <i>pea32DH</i> / siRNA ctrl	P	Nom complet du gène	Fonction
<i>rdm1</i>	829347	4,24	<0,00005	RAD52 motif1	code une protéine impliquée dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN
<i>myh7</i>	336643	4,22	<0,00005	myosin. heavy polypeptide 7. cardiac muscle. Beta	code une protéine impliquée dans la contraction des cellules musculaires cardiaques
<i>igfbp7</i>	921450	4,12	<0,00005	insulin like growth factor binding protein 7	code une protéine régulant la prolifération des kératinocytes
<i>hmmr</i>	339138	3,20	0,0014	hyaluronan mediated motility receptor	code une protéine impliquée dans le maintien du fuseau de division mitotique régulant ainsi la prolifération des cellules
<i>notch3</i>	402835	2,80	<0,00005	notch gene homologue 3	code un récepteur membranaire contrôlant la prolifération et la différenciation des cellules, notamment dans le système nerveux central
<i>trp53inp1</i>	906306	2,60	0,0033	transformation related protein 53 inducible nuclear protein	code une protéine partenaire de la protéine p53. Trp53inp1 inhibe la prolifération des cellules est induit la mort cellulaire par apoptose
<i>fst</i>	825625	2,50	<0,00005	follistatin	code une protéine régulant négativement l'activité de la voie de signalisation du TGF Beta
<i>sesn2</i>	839098	2,34	0,0052	sestn2	gène cible de la protéine p53, code une protéine régulant la prolifération par l'intermédiaire des voies mTOR et TGF Beta
<i>LOC435791</i>	893596	2,26	0,0047	interferon zeta	ND
<i>nusap1</i>	932873	2,19	0,0001	nucleolar and spindle associated protein 1	code une protéine impliquée dans la mise en place du fuseau de division pendant la mitose
<i>tra1</i>	529365	0,48	0,0009	tumor rejection antigen 1	code une protéine maintenant les cellules dans un état non différencié
<i>rras2</i>	401001	0,48	0,0032	related RAS viral (r-ras)	oncogène codant une protéine impliquée dans la morphogènesée des cellules rénales et la transformation des cellules
<i>stip1</i>	905667	0,47	0,0064	stress-induced phosphoprotein 1	code une protéine ligand de la protéine Prion, impliquée dans la croissance des neurites
<i>snn</i>	764223	0,45	0,0011	stannin	code un protéine au rôle peu étudié mais pouvant participer à la migration des cellules endothéliales HUVEC
<i>eps8</i>	400066	0,45	<0,00005	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	code une protéine régulant la mise en place du cytosquelette d'actine participant ainsi à la formation des filopodes et à la migration des cellules
<i>fgfr1</i>	814680	0,38	0,0005	fibroblast growth factor receptor 1	code une protéine récepteur de la voie du FGF. Le FGFR1 module les propriétés de prolifération de migration et de différenciation des cellules
<i>tuba7</i>	715233	0,30	0,00450	tubulin. alpha 7	code une protéine composante des microtubules du cytosquelette
<i>has2</i>	337659	0,22	0,00050	hyaluronan synthase 2	code une protéine impliquée dans le métabolisme de la Hyaluronane et dans le contrôle des propriétés de migration et de prolifération
<i>csh1 plig</i>	578632	0,17	0,00120	chorionic somatomammotropin hormone 1 placental lactogen I gamma	codent des hormones placentaires de la famille de la prolactine impliquée dans la croissance du fœtus et de la glande mammaire
<i>csh1 plib</i>	664595	0,16	0,00090	chorionic somatomammotropin hormone 1 placental lactogen-I beta	

Tableau 4. Noms et fonctions de gènes dont l'expression est régulée dans les cellules MMT suite à la répression de l'expression de Pea3. L'expression relative (colonne verte) représente l'expression des gènes dans les cellules MMT *sipea32DH* par rapport aux cellules MMT si contrôle. Le tableau répertorie aussi les noms et symboles des gènes, leur valeur p (P) ainsi que leur numéro d'identification dans les puces à ADN (gene ID) et des exemples de leurs fonctions décrites dans la littérature.

Dans cette publication, l'analyse du rôle des gènes décrits dans la littérature a permis de les regrouper dans les catégories suivantes :

- des gènes régulant les propriétés de **migration** et d'**invasion** comme les gènes *fgr1*, *eps8*, *snn*, *sesn2*, *fst1*, *trp53inp1*, *hmmr*,
- des gènes impliqués dans le contrôle des capacités de **prolifération** de **différenciation cellulaires** comme les gènes *fgr1*, *rras2*, *tra1*, *nusap1*.

Ces quelques exemples de gènes décrits ici reflètent très bien la pertinence de l'analyse transcriptomique réalisée dans les cellules MMT et de son utilisation comme outil de décryptage des relais moléculaires de Pea3. L'exploitation de ces données devra nous aider à mieux comprendre comment le facteur de transcription Pea3 peut moduler les propriétés de prolifération, de migration ou encore d'invasion des cellules cancéreuses. De plus les catégories représentées ici sont similaires à celles notées lors de l'analyse des gènes régulés par Pea3 dans le modèle TAC (cf paragraphe précédent) ce qui indique encore un peu plus l'importance de Pea3 pour le contrôle des ces propriétés cellulaires.

c. Recherche des gènes modulés par Pea3, pertinence pour la compréhension des mécanismes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires

L'analyse bibliographique des gènes régulés par Pea3 dans les modèles TAC et MMT et présentée dans le tableau 5 indique qu'un certain nombre d'entre eux sont déjà documentés pour participer aux événements de morphogenèse mammaire et/ou de tumorigenèse mammaire. C'est le cas des gènes *mmp13*, *serpine2*, *cxcl5*, *cdkn2b* et *xist*, pour le modèle TAC, et des gènes *igfbp7*, *hmmr*, *notch3*, *tra1*, *fgfr1*, *has2*, *csh1/plig* et *csh1/plig* pour les cellules MMT. Les données disponibles et concernant leur influence sur le comportement des cellules mammaire normales ou cancéreuses sont résumées dans le tableau 5.

En ce qui concerne les autres gènes présentés ici, ils n'ont jamais été décrits, à notre connaissance, pour intervenir dans les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Donc ces nouvelles données nous éclairent sur le mode d'action de Pea3 dans les cellules épithéliales mammaires TAC et MMT mais en plus permet d'identifier de **nouveaux gènes** ayant potentiellement un rôle lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.

TAC	Glande mammaire	MMT	Glande mammaire
<i>mmp13</i>	contrôle le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses mammaires, notamment dans les os, en permettant la dégradation du tissu osseux (Nannuru et al., 2010)	<i>igfbp7</i>	son expression est augmentée dans les cancers du sein inflammatoires (Bièche, 2004)
<i>serpine2</i>	Son expression est associée aux cancers exprimant le récepteur aux œstrogènes ERalpha et pourrait constituer un marqueur de mauvais pronostic (Martin et al., 2008)	<i>hmmr</i>	son expression est associée à l'agressivité des tumeurs du sein (Wang, 1998)
<i>4930486L2</i> <i>4Rik</i>	L'expression ectopique de la testine dans des cellules cancéreuses mammaires induit la mort par apoptose (Sarti et al., 2005)	<i>notch3</i>	la voie Notch3 contrôle l'état de différenciation des cellules épithéliales luminales de la glande mammaire. Cette voie peut interagir avec la voie Erbb2 dans les cellules tumorales mammaires (Yamaguchi, 2008; Raouf, 2008)
<i>cxcl5</i>	Impliqué dans le recrutement des cellules immunitaires myéloïdes au niveau des tumeurs mammaires favorisant la formation de métastases induites par le TGF Beta (Yang et al., 2008)	<i>tra1</i>	la protéine Tra1 contrôle la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en régulant l'activité du récepteur aux œstrogènes ERalpha (Yanagisawa, 2002)
<i>cdkn2b</i>	Impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire induit par le TGF Beta dans les cellules épithéliales mammaires. Son expression est réprimé dans les cellules cancéreuses mammaires (Sandhu et al., 1997)	<i>rras2</i>	La surexpression de Rras2 transforme les cellules épithéliales mammaires dans lesquelles il régule notamment l'activité de la voie du TGF Beta. Son expression est augmentée dans les tumeurs du sein (Clark, 1996; Erdogan 2007)
<i>xist</i>	son expression est dérégulée dans les cancers du sein (Ganesan et al., 2002)	<i>fgfr1</i>	l'activation de la voie de signalisation du FGFR1 dans des cellules épithéliales mammaires régule leur prolifération, leur migration en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse (Turner et Grose, 2010; Xian, 2009)
		<i>has2</i>	participe à l'agressivité des cellules tumorales mammaires (Udabage, 2005 a et b)
		<i>csh1 plig</i>	Hormones placentaires impliquées dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales mammaires au cours de la gestation. Leur expression dans les tumeurs
		<i>csh1 plib</i>	participe à la cancérogenèse (Russo et Russo, 1998)

Tableau 5. Liste de gènes ayant des fonctions lors du développement de la glande mammaire ou sa dérive en cancer. Description résumée de la fonction des gènes présentés dans les tableaux 3 et 4 et ayant été décrits dans le contexte du développement de la glande mammaire de la tumorigenèse mammaire ou lors de l'étude de lignées cellulaires mammaires normales et cancéreuses.

Sur l'ensemble des gènes ainsi mis en évidence par ces expériences de puces, nous avons initié l'étude de la régulation par le facteur Pea3 de certains d'entre eux, afin de préciser les modalités de régulation de leur expression par Pea3 ainsi que leur implication dans les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires régulés par Pea3. En suivant cette ligne directrice, nous avons entrepris l'étude du gène *cycline d2*, gène pour lequel les données et les caractéristiques de régulation par Pea3 ou de son rôle dans la morphogenèse ou la tumorigenèse mammaire sont les plus complètes.

V. Le gène *cycline d2* un nouveau gène cible direct du facteur de transcription Pea3 : étude des modalités de régulation

Les protéines de la famille des Cyclines D régulent la prolifération des cellules eucaryotes en assurant l'entrée et la progression en phase G1 du cycle cellulaire après association aux protéines kinases CDKs suite à la stimulation des cellules par des facteurs de croissance. Les cyclines D ont aussi été montrées comme pouvant réguler les propriétés de migration, d'invasion ou encore de différenciation cellulaires *via* leur fonction de régulateurs du cycle cellulaire ou en agissant directement en tant que cofacteurs transcriptionnels régulant la transcription de certains gènes (Fu *et al.*, 2004). Ainsi, elles sont largement impliquées lors du développement embryonnaire mais aussi lors des étapes de cancérisation dans de nombreux tissus (Glickstein *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 1997).

La Cycline D2 est codée par un gène nommé *cycline d2* ou *ccnd2* composé de 5 exons, situé sur le chromosome 12 chez l'homme et le chromosome 6 chez la souris. Récemment, l'existence d'un nouvel ARN messager issu d'un épissage alternatif a été décrite chez la souris, l'homme et le xénope. Ce mécanisme d'épissage alternatif permet la génération d'une nouvelle protéine tronquée appelée Cycline D2 tronquée et possédant une nouvelle partie C terminale (Cycline D2 Trc, Figure 34), protéine dont les fonctions restent encore peu étudiées (Denicourt *et al.*, 2003; Denicourt *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009).

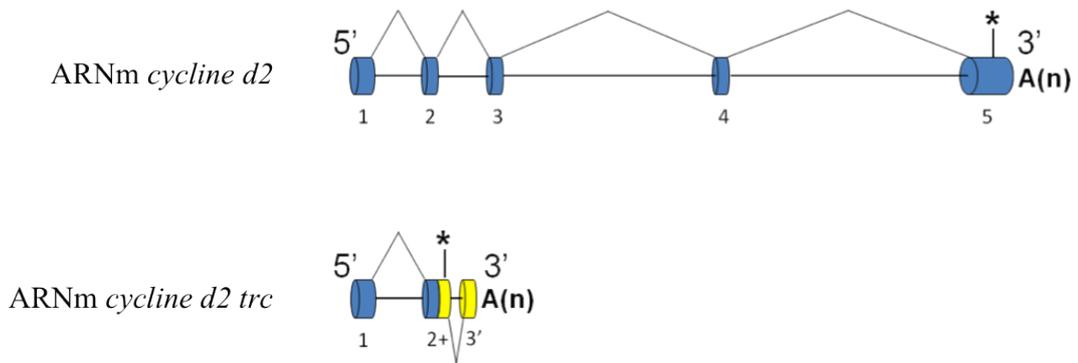


Figure 34. Représentation graphique de la structure des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc*. L'ARN messager *cycline d2* de 6,5 kb est généré par l'excision des introns et l'épissage des 5 exons du gène *cycline d2*. L'emplacement du codon d'arrêt de la traduction est symbolisé par une étoile, il se trouve dans l'exon 5. La traduction de cet ARN messager génère une protéine d'un poids moléculaire de 34 kDa environ. L'ARN messager *cycline d2 trc* de 1,1 kb est généré par un mécanisme d'épissage alternatif entraînant l'épissage de nouveaux exons appelés 2+ et 3' avec l'exon 1 et le raccourcissement du transcrit par l'apparition d'un nouveau signal de polyadénylation. L'emplacement du codon d'arrêt de la traduction, symbolisé par une étoile, se trouve dans l'exon 3'. La traduction de cet ARN génère une protéine d'un poids moléculaire de 18 kDa environ.

D'après (Denicourt *et al.*, 2003; Denicourt *et al.*, 2008)

Au début de cette étude peu de données étaient disponibles concernant le rôle des Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans la régulation des étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Kong et collaborateurs avaient cependant montré que la surexpression de la Cycline D2 dans la glande mammaire de souris entraînait un défaut de différenciation des alvéoles de sécrétion associé à une augmentation du nombre de cellules en prolifération pendant la gestation (Kong *et al.*, 2002). Concernant l'aspect tumorigenèse, l'expression de la Cycline D2 est fréquemment montrée pour être réprimée dans les tumeurs du sein et les métastases associées, sans que son rôle dans ce contexte ne soit pour autant compris (Evron *et al.*, 2001).

Connaissant le rôle de Pea3 dans le contrôle des étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires, au début de notre étude, nous avons alors envisagé de détailler les points suivants:

- la régulation de l'expression du gène *cycline d2* par les facteurs de transcription du groupe PEA3 dans le modèle cellulaire d'étude de la morphogenèse, les cellules TAC,
- l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* lors du développement de la glande ainsi que dans des tumeurs humaines du sein et s'il existe une corrélation avec l'expression de l'ARN messenger *pea3*,
- la fonction des deux isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc lors des événements morphogénétiques induits par Pea3,
- le rôle du facteur de transcription Pea3 dans le contrôle de la prolifération cellulaire et le lien fonctionnel entre Pea3, Cycline D2 ou Cycline D2 Trc.

1- Pea3 régule l'expression du gène *cycline d2* dans les cellules épithéliales mammaires

Afin de confirmer les données obtenues dans les analyses transcriptomiques à grande échelle, nous avons analysé l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 tronquée (cycline d2 trc)* par RT-PCR quantitative, dans les cellules TAC suite à une inhibition ou une surexpression de Pea3.

Ainsi, la transfection transitoire des siRNA *sipea32DH* et *sipea3pool* dans les cellules entraîne une diminution de l'ordre 40 à 50% de l'expression des deux isoformes (Figure 35A). L'analyse dans les modèles de surexpression de Pea3 (TAC PLPCX Pea3-V5 et TAC Pea3-8) indique une augmentation de l'expression des deux transcrits du gène *cycline d2*, l'expression de la forme tronquée étant légèrement plus augmentée par Pea3 que celle de la forme pleine longueur (Figure 35B). Toutes ces données montrent que le facteur de transcription Pea3 régule l'expression du gène *cycline d2* au niveau transcriptionnel et valide les données obtenues dans les expériences de puces à ADN.

L'analyse de l'expression de la protéine Cycline D2 dans les modèles de surexpression de Pea3 par Western blot grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique, indique une augmentation de l'expression de la protéine Cycline D2 suite à la surexpression de Pea3 (Figure 36). Ce résultat est donc en accord avec les données de RT-PCR quantitative. Concernant la Cycline D2 Trc, nous ne disposons pas pour l'instant d'un anticorps permettant une détection suffisante et spécifique de cette protéine par Western Blot.

La somme de ces résultats indique que le facteur de transcription Pea3 module l'expression du gène *cycline d2* au niveau transcriptionnel, modulation qui se traduit par une augmentation de la quantité de protéine, au moins pour l'isoforme Cycline D2, dans les cellules épithéliales mammaires TAC.

2- Pea3 module la transcription du gène *cycline d2*

Afin de déterminer par quels mécanismes Pea3 régule la quantité d'ARN messager *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans nos cellules nous avons entrepris d'étudier le promoteur du gène. Pour cela nous avons cloné, dans un vecteur rapporteur pG14basic, la partie d'ADN génomique allant de -1629 paires à -1 paire de bases en amont du codon d'initiation de la traduction de ce gène, séquence déjà documentée comme possédant une activité promotrice (Bouchard *et al.*, 1999; Jun *et al.*, 1997). Ce fragment d'ADN est dénommé cd2 1629.

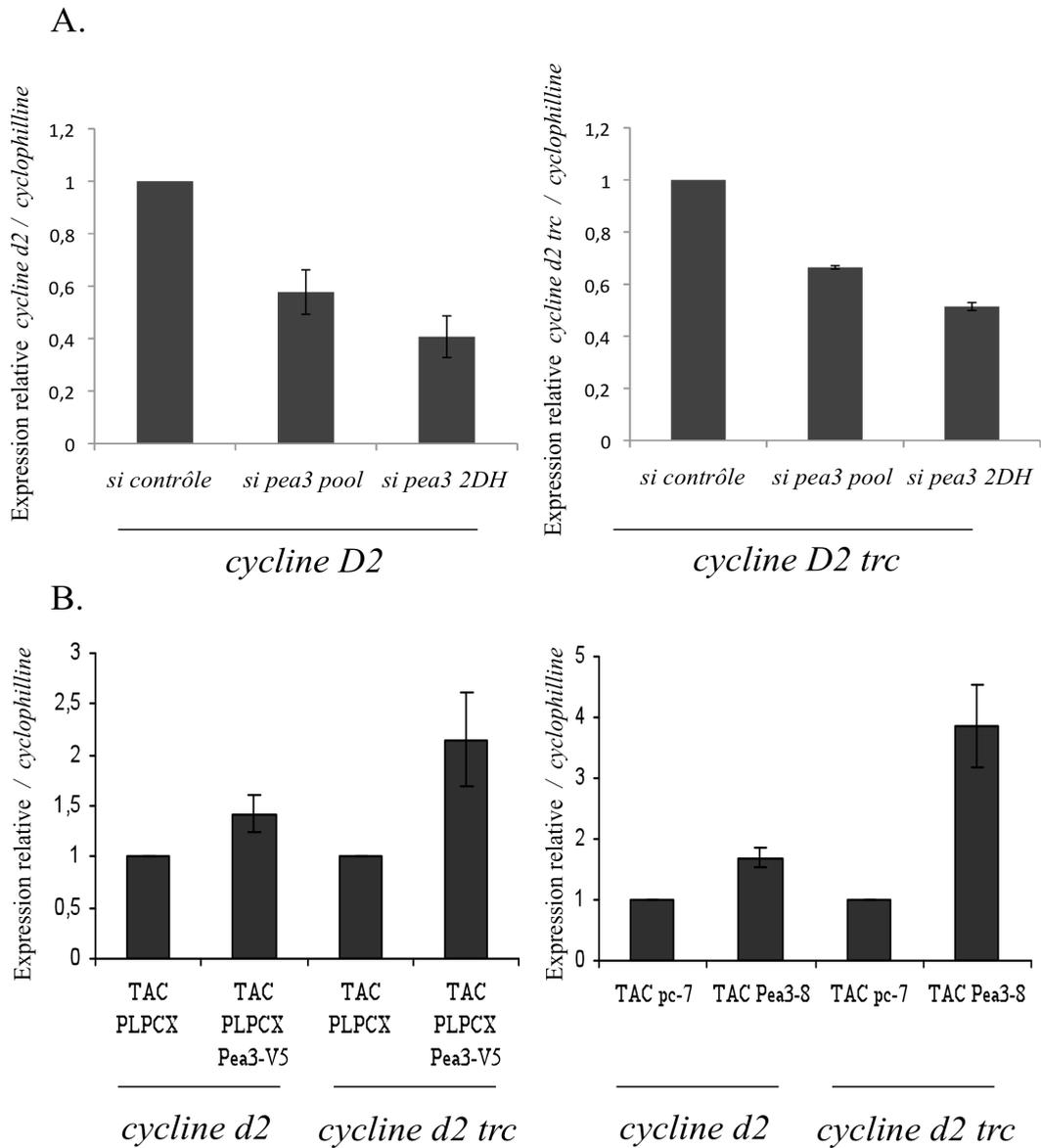


Figure 35. Expression transcriptionnelle des deux isoformes du gène *cycline d2* suite à la modulation de l'expression de Pea3 dans les cellules TAC. A. Expression relative des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans les cellules TAC après transfection transitoire des siRNA *sipea3pool* et *sipea32DH* par rapport aux cellules TAC transfectées avec un siRNA contrôle. **B.** Expression relative des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans les modèles de surexpression de Pea3 TAC PLPCX Pea3-V5 et TAC Pea3-8 par rapport aux cellules témoins TAC PLPCX et TAC pc-7. L'expression des gènes ARN messager *cycline d2* et *cycline d2 trc* et normalisée par l'expression de l'ARN messager *cyclophiline*.

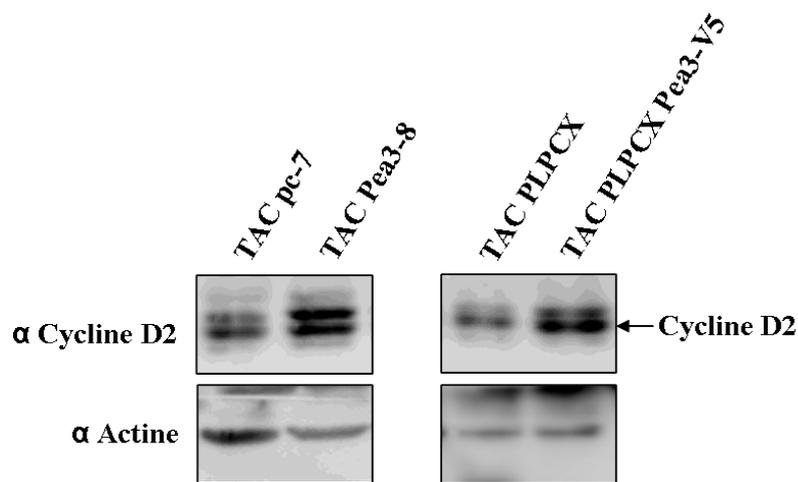


Figure 36. Expression des protéines Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les modèles de surexpression de Pea3. La flèche (\rightarrow) indique la bande correspondant à la protéine Cycline D2 apparaissant à un poids moléculaire de 34 KiloDalton après migration électrophorétique dans un gel d'acrylamide. La détection de l'actine est utilisée en tant que témoin d'équicharge.

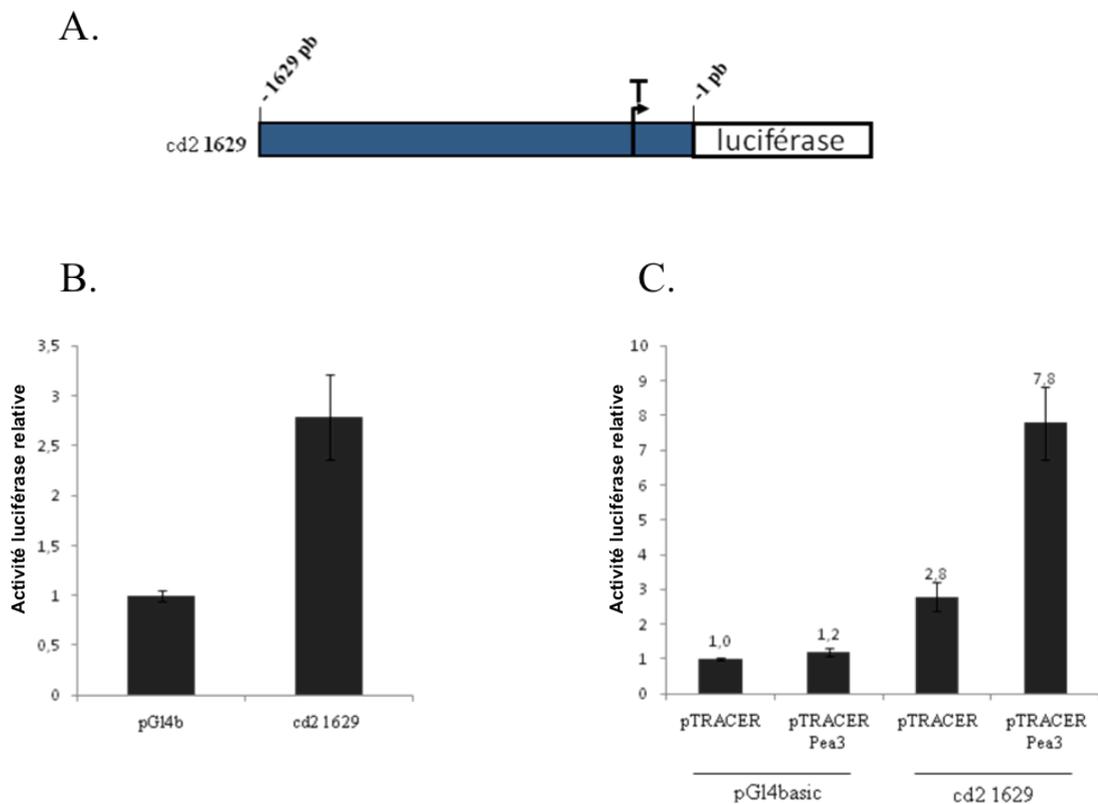


Figure 37. Analyse de l'effet de Pea3 sur l'activité du promoteur du gène *cycline d2*. **A.** Schéma représentant le fragment de promoteur cd2 1629 fusionné au gène rapporteur luciférase. La numérotation des nucléotides en paires de bases (pb) est indiquée relativement au codon d'initiation de la traduction T= site d'initiation de la transcription. **B.** Activité du vecteur rapporteur pG14basic vide et du promoteur cd2 1629 après transfection transitoire dans les cellules TAC. **C.** Analyse de l'activité du pG14 basic et du promoteur cd2 1629 suite à la transfection transitoire dans les cellules TAC et la surexpression de Pea3 via le vecteur d'expression pTRACER Pea3.

Nous avons dans un premier temps cherché à savoir s'il possédait une activité promotrice dans les cellules TAC. La transfection transitoire de cd2 1629 montre qu'il possède une activité 2,8 fois supérieure à celle du vecteur pGl4basic vide (Figure 37). Ce résultat confirme donc, en accord avec les données de la littérature, que le fragment d'ADN cd2 1629 possède une activité promotrice dans nos cellules.

Dans un deuxième temps nous avons voulu déterminer si le facteur de transcription Pea3 était capable de moduler l'activité de ce promoteur. Pour cela nous avons réalisé des co-transfections transitoires de la construction contenant cd2 1629 avec un vecteur d'expression pTRACER vide ou contenant un ADN complémentaire permettant l'expression de Pea3 nommé pTRACER-Pea3. L'expression de Pea3 entraîne une augmentation de 2,3 fois de l'activité du promoteur cd2 1629 par rapport à la condition pTRACER.

Ces données indiquent que le facteur de transcription Pea3 transactive le promoteur du gène *cycline d2* dans les cellules épithéliales TAC ce qui est en accord avec la régulation de l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* observée suite à la modulation de son expression.

3- Recherche des séquences génomiques permettant la régulation de l'activité promotrice par Pea3

Dans le but de mieux comprendre comment Pea3 régule l'activité du promoteur du gène *cycline d2* nous avons entrepris de déterminer quelles étaient les séquences d'ADN impliquées. Pour cela nous avons affiné notre recherche en réalisant des délétions de la région promotrice cd2 1629 puis en analysant leur activité après co-transfection avec les vecteurs pTRACER ou pTRACER-Pea3. Les différentes délétions réalisées ont été nommées cd2 625, cd2 450, cd2 258, cd2 168, cd2 113, cd2 64 et sont présentées dans la Figure 38A.

La Figure 38B présente l'activité basale des différents fragments après co-transfection avec le vecteur pTRACER. La construction cd2 625 possède une activité promotrice égale à celle de la construction cd2 1629. Les mutants de délétion cd2 450, 258 et 168 possèdent une activité environ 4 fois supérieure à celle du fragment cd2 1629 ce qui

indique la perte d'éléments de régulation négative de l'activité du promoteur. Le fragment cd2 113 a une activité comparable à celle du fragment cd2 1629 ce qui nous indique que les principales séquences participant à l'activité de la région promotrice sont situées dans la zone soustraite du fragment cd2 168 pour obtenir le fragment cd2 113 (Figure 38B). Enfin le mutant de délétion cd2 64 ne possède pas d'activité promotrice.

L'effet de transactivation de Pea3 sur les différents fragments de promoteur est représenté dans la Figure 38C. L'activité du fragment cd2 625 est augmentée comme celle du fragment cd2 1629. L'effet de transactivation de Pea3 est augmenté pour les fragments cd2 450, cd2 258 et cd2 168 respectivement de 4,8, 7,5 et 6,9 fois (Figure 38 C). Le fragment cd2 113 est transactivé 2,7 fois ce qui indique la perte des principales séquences permettant la transactivation du promoteur par le facteur de transcription Pea3. Enfin la construction cd2 64 n'est pas transactivée par Pea3.

Tous ces résultats indiquent qu'il existe une séquence de 55 paires de bases correspondant à la délétion entre les constructions cd2 168 et cd2 113 et qui contient les éléments majeurs de régulation de l'activité du promoteur et de la transactivation par Pea3. Cette séquence se situe entre -343 paires de bases et -288 paires de bases par rapport au codon d'initiation de la traduction du promoteur du gène *cycline d2* et est notée cd2 55 (Figure 39).

4- *cycline d2*, gène cible direct du facteur de transcription Pea3

L'analyse de la séquence cd2 55 indique un haut niveau de conservation entre la souris le rat et l'homme. De plus nous avons mis en évidence trois motifs consensuels de type EBS qui sont très conservés entre la souris, le rat et l'homme ainsi que leurs nucléotides flanquants (Figure 39). Ce haut niveau de conservation combiné aux résultats de transactivation indique que cette séquence de 55 paires de bases est cruciale pour l'activité du promoteur. En considérant cette analyse nous avons cherché à tester :

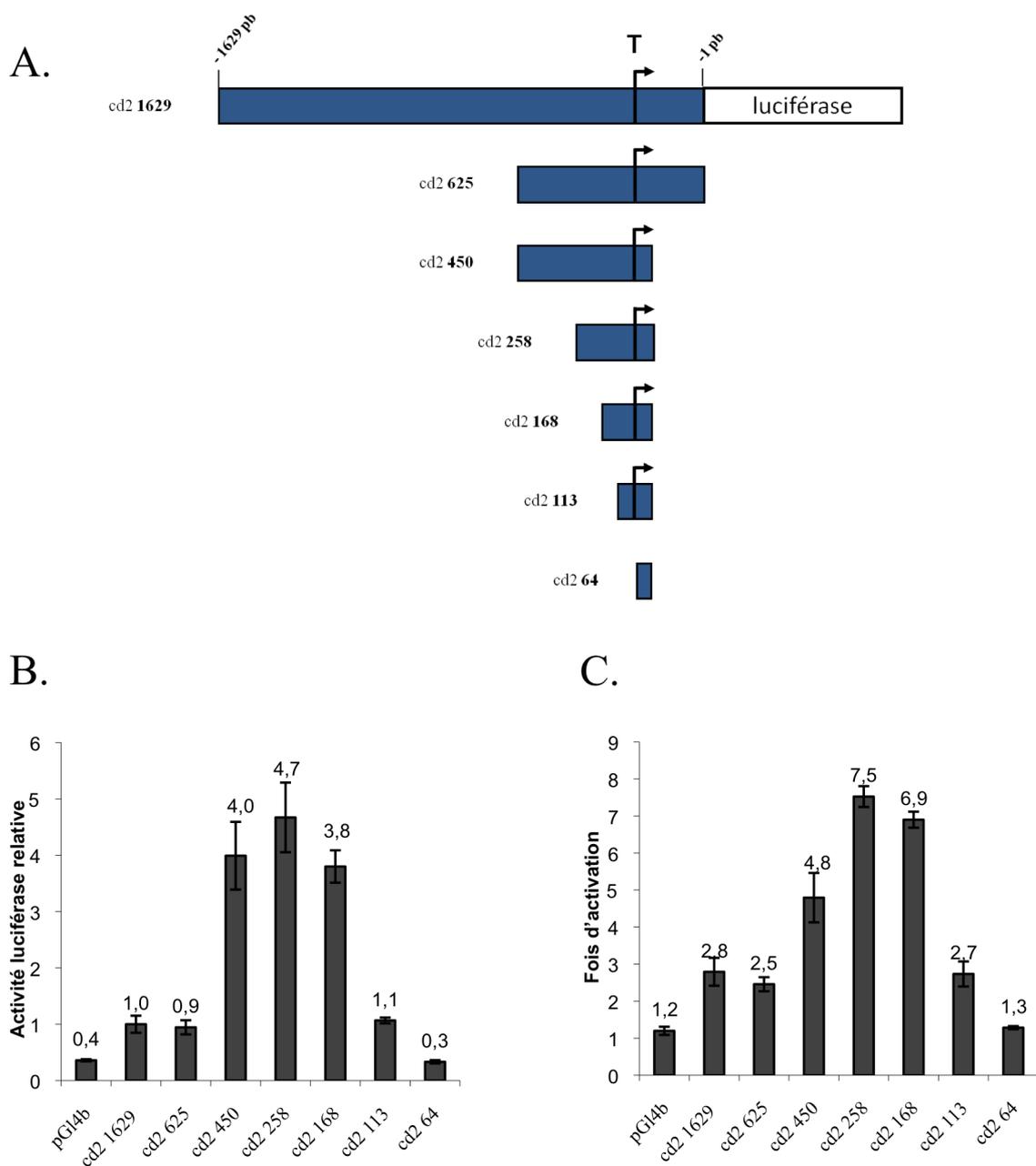


Figure 38. Analyse de l'effet de Pea3 sur l'activité des fragments de promoteur du gène *cycline d2*. **A.** Schéma représentant les fragments de promoteur du gène *cycline d2* fusionnés au gène rapporteur luciférase. T= site d'initiation de la transcription. **B.** Activité des fragments de promoteur après transfection transitoire dans les cellules TAC. **C.** Analyse de l'activité des fragments de promoteur suite à la transfection transitoire dans les cellules TAC et la surexpression de Pea3.

- la fonctionnalité des sites consensus de type EBS en testant l'effet de mutations ponctuelles de ces sites sur l'activité du promoteur du gène *cycline d2* et la transactivation par *Pea3*,
- la présence de *Pea3* sur cette région par des expériences d'immuno-précipitation de la chromatine.

L'analyse de la fonctionnalité des sites consensus EBS retrouvés dans le fragment cd2 55 a été entreprise par mutation des trois sites conservés dans les fragments cd2 258 et 168 (Figure 40A). Les fragments mutés correspondants ont été nommés cd2 258mut et cd2 168mut. La mutation combinée des trois sites EBS potentiels diminue de 50% l'activité transcriptionnelle des fragments cd2 258 et cd2 168 ce qui indique l'importance des nucléotides ciblés dans le contrôle de l'activité promotrice de ces fragments. Concernant l'activité de transactivation par *Pea3*, elle est partiellement diminuée par les mutations dans le fragment cd2 258 alors qu'elle est abolie dans le fragment cd2 168 mut. Ces résultats montrent que la région étudiée et notamment les sites consensus de la famille ETS sont importants pour l'activité de *Pea3* sur le fragment cd2 168, plus petit fragment conservant une transactivation maximale par *Pea3* (Figure 40B).

La présence de *Pea3* au niveau du promoteur a été évaluée par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). *Pea3* a été immunoprécipité en utilisant un anticorps spécifique et un anticorps dirigé contre la protéine Bax a été utilisé en contrôle négatif d'interaction à l'ADN. L'analyse par PCR de l'ADN génomique récupéré suite à l'immunoprécipitation a été réalisée en utilisant 2 couples d'oligonucléotides différents : un couple permettant l'amplification du fragment d'ADN génomique contenant la région cd2 55 et un couple permettant l'amplification d'une région du promoteur du gène *icam-1* déjà décrit dans la littérature pour interagir avec *Pea3* (de Launoit *et al.*, 1998). Ces oligonucléotides ont alors été considérés comme témoin positif d'amplification.

Ainsi, l'immunoprécipitation de *Pea3* permet l'amplification d'un signal spécifique alors que ce signal n'est quasiment pas détectable lorsque l'on utilise un anticorps dirigé contre la protéine Bax. De la même manière on observe une amplification de l'ADN génomique correspondant au promoteur du gène *icam-1* (Figure 41). Ces résultats indiquent que *Pea3* est présent sur le promoteur du gène *cycline d2*.

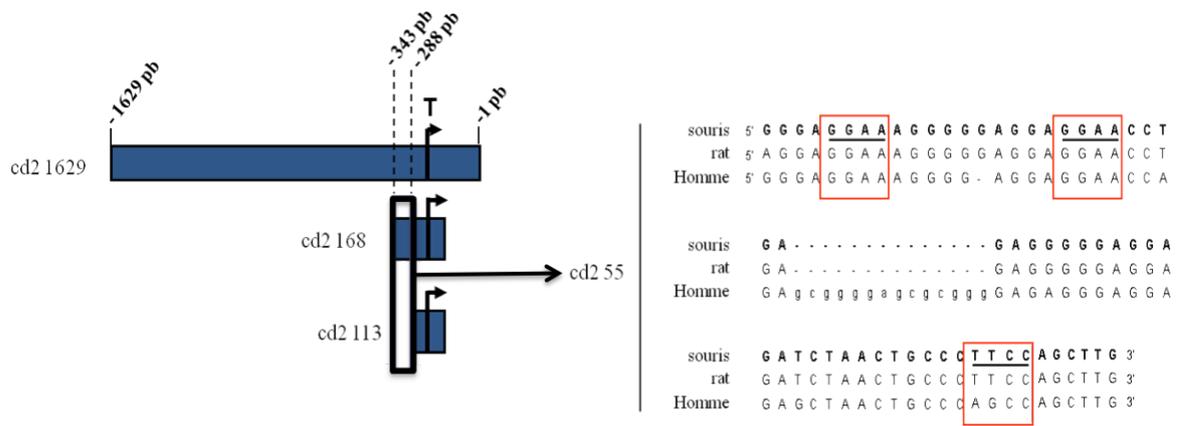


Figure 39. Analyse de la séquence du fragment cd2 55 du gène *cycline d2* et de sa conservation entre la souris, le rat et l'homme. Le schéma indique aussi la position du fragment cd2 55 par rapport aux constructions cd2 1629, 168 et 113. Les rectangles rouges indiquent la présence des sites consensus EBS 5'GGAA/T 3'.

A.

sauvage 5' GGGAGGAAAGGGGGAGGAGGAACCTGAGAGGGGGAGGAGATCTAACTGCCCTTCCAGCTG 3'
 mutations 5' GGGACCAAAGGGGGAGGACCAACCTGAGAGGGGGAGGAGATCTAACTGCCCTTCTAGCTG 3'

B.

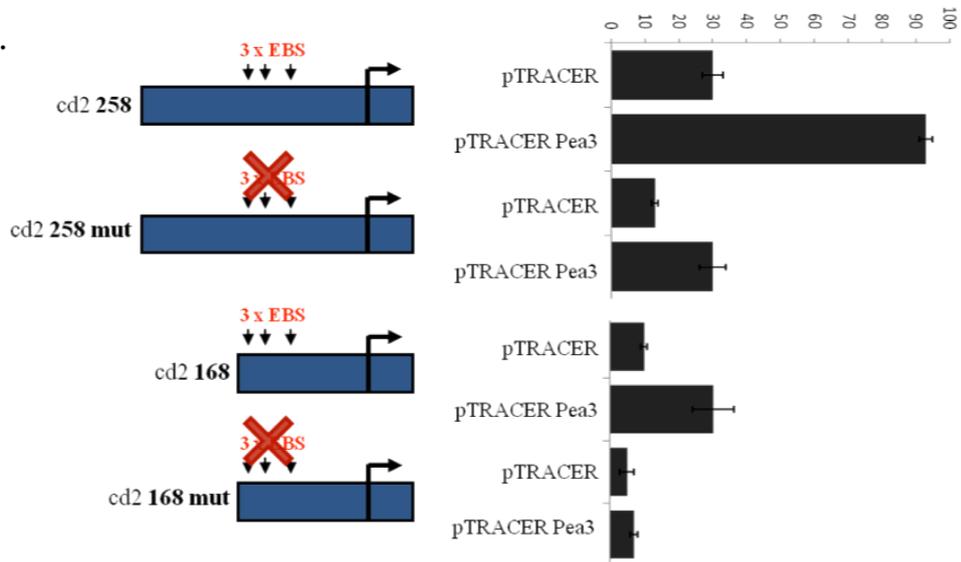


Figure 40. Analyse de l'effet des mutations des sites consensus EBS sur l'activité des fragments de promoteur du gène *cycline d2* et la transactivation par Pea3. A. Séquences des sites EBS localisées dans le fragment cd2 55 (sauvage) et description des mutations apportées dans les fragments cd2 258 (cd2 258 mut) et cd2 168 (cd2 168 mut) (mutations). B. Activité des fragments cd2 258, cd2 168, cd2 258 mut et cd2 168 mut évaluée par analyse de l'activité luciférase suite à la co-transfection transitoire, dans les cellules TAC, avec les plasmides pTRACER ou pTRACER Pea3.

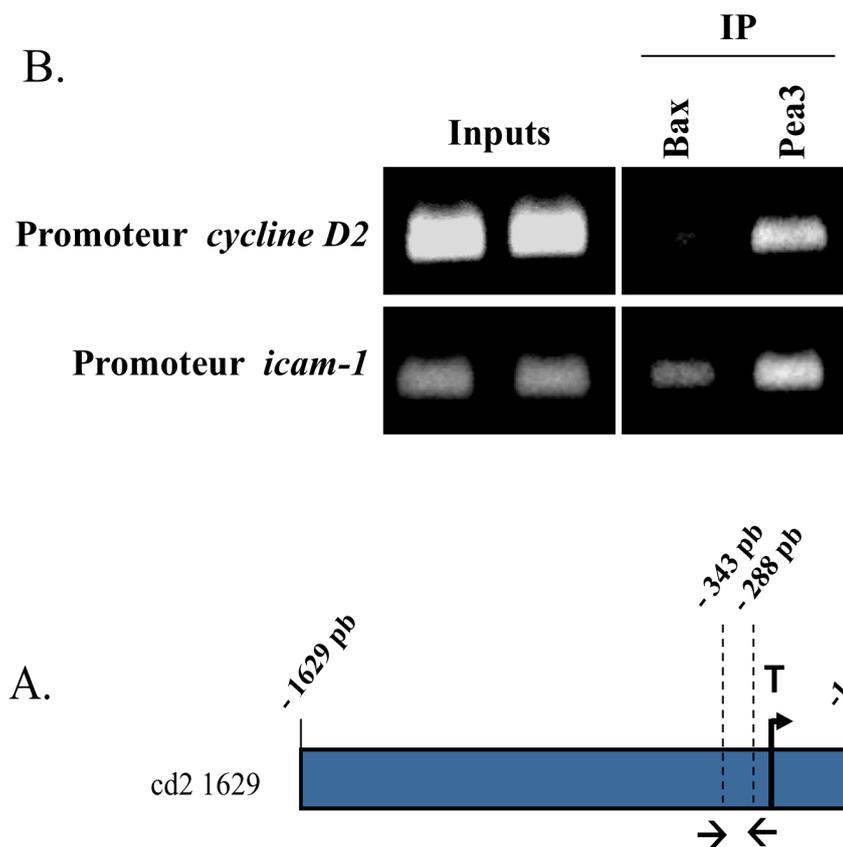


Figure 41. Analyse de la présence du facteur de transcription Pea3 sur le promoteur du gène *cycline d2* par immunoprécipitation de la chromatine. **A.** Localisation sur le fragment cd2 1629 des oligonucléotides (→ ←) permettant l'amplification par PCR d'une partie du promoteur du gène *cycline d2* contenant le fragment cd2 55. **B.** Résultats de l'amplification par PCR des promoteurs des gènes *cycline d2* et *icam-1* suite à l'immunoprécipitation des protéines Pea3 ou Bax. Les « Inputs » sont des amplifications de l'ADN génomique avant immunoprécipitation de Pea3 ou Bax.

L'ensemble de ces résultats montrent que le gène *cycline d2* est un gène cible direct du facteur de transcription Pea3 dans les cellules épithéliales mammaires TAC. De plus, dans ces cellules, Pea3 est capable de réguler l'expression des deux isoformes *cycline d2* et *cycline d2 trc*. Nous nous sommes ensuite interrogés sur la fonction de ces isoformes de la Cycline D2 au cours des effets morphogénétiques induits par Pea3 dans les cellules TAC.

VI. Exploration du rôle de la Cycline D2 dans la morphogénèse et la tumorigénèse mammaires – Corrélation avec l'activité de Pea3

Le bilan de nos expériences indique que la régulation de l'expression des Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les cellules TAC suite à la surexpression de Pea3 est corrélée à l'augmentation des propriétés morphogénétiques de ces cellules (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Ceci nous a donc encouragé à étudier le rôle de ces deux protéines lors de la morphogénèse mammaire et à savoir s'il existe un lien fonctionnel avec le facteur de transcription Pea3. Plusieurs points ont alors été considérés :

- Quels sont les profils d'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* au cours du développement de la glande mammaire ?
- Existe-t-il une corrélation avec l'expression du transcrit *pea3* ?
- Les Cycline D2 et Cycline D2 Trc interviennent-elles dans les effets morphogénétiques induits par Pea3 dans le modèle TAC ?
- Peut-on établir un lien Pea3/Cycline D2 dans la tumorigénèse ?

1- Pea3, Cycline D2 et morphogénèse mammaire

*a. Etude de l'expression des gènes *pea3* et *cycline d2* lors du processus de morphogénèse mammaire*

Des données obtenues dans l'équipe et dans d'autres laboratoires indiquent que l'expression de Pea3 est majoritairement observée pendant les étapes de puberté et de gestation, étapes pendant lesquelles il module les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion des cellules épithéliales (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003; Kurpios *et al.*, 2009). Compte tenu de la régulation de l'expression des isoformes du gène *cycline d2* par Pea3 et du rôle de Pea3 lors de la morphogénèse mammaire nous avons voulu savoir si un parallèle

pouvait-être établi entre l'expression de l'ARN messager *pea3* et l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* lors des étapes de développement de la glande mammaire.

Pour cela les glandes mammaires de souris C57Black ont été prélevées à différents stades de développement, à savoir pendant la puberté (phase de développement intense de l'arbre épithélial par morphogenèse de branchement), à l'état adulte (période sans activité marquée), pendant la gestation (période de différenciation lobulo-alvéolaire), pendant l'allaitement (lorsque les lobules sécrétant le lait sont pleinement fonctionnels) et pendant l'étape d'involution (phase de régression de l'arbre épithélial par apoptose). Ainsi, les ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* sont fortement exprimés pendant la puberté et la gestation (Figure 42). Le transcrit *cycline d2* est aussi fortement exprimé pendant l'étape d'involution et dans une moindre mesure chez l'adulte et pendant la lactation, alors que *pea3* et *cycline d2 trc* ne sont quasiment pas détectables dans ces trois stades de développement de la glande mammaire (Figure 42).

Nous observons donc une corrélation d'expression entre *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* pendant les étapes de puberté et de gestation qui correspondent au développement intense de la glande par morphogenèse de branchement et différenciation lobulo-alvéolaire. Le transcrit *cycline d2* est aussi exprimé lors des étapes de lactation, d'involution et chez l'adulte, étapes pendant lesquelles nous ne parvenons pas à détecter la présence de *pea3* et de *cycline d2 trc*. Les analyses d'expression indiquent donc que l'expression de *pea3* est toujours accompagnée de l'expression des deux transcrits *cycline d2* et *cycline d2 trc* lors du développement de la glande mammaire, ce qui peut être corrélé aux données de régulation de la transcription du gène *cycline d2* par Pea3 dans le modèle TAC.

b. Etude de la fonction du gène cycline d2, relation avec le facteur de transcription Pea3

Prenant en considération les résultats concernant la régulation de l'expression du gène *cycline d2* par Pea3 associés aux données d'expression obtenues dans le contexte du développement de la glande mammaire, nous avons voulu étudier la fonction des deux isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc.

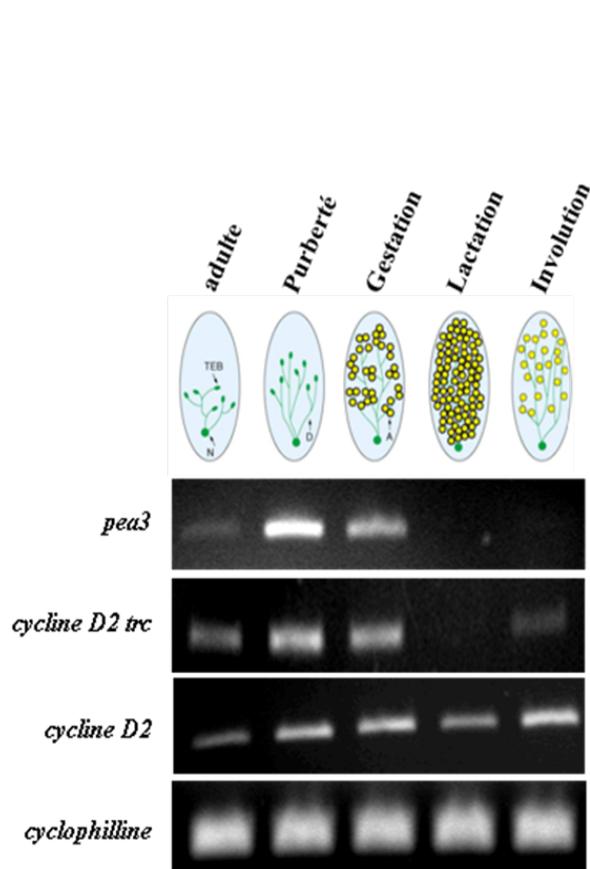


Figure 42. Analyse par RT-PCR de l'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* lors des différentes étapes de développement de la glande mammaire. L'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* est analysée dans des extraits de glandes mammaires prélevées chez des souris adultes, en phase de puberté, gestantes, lactantes, et lors de l'involution de la glande mammaire. L'expression de l'ARN messager *cyclophiline* est utilisée comme référent.

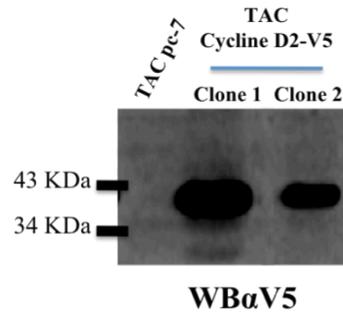
Pour cela deux stratégies complémentaires ont été envisagées:

- surexprimer de façon stable et constitutive la Cycline D2 ou la Cycline D2 Trc dans les cellules TAC et analyser leur capacité morphogénétique, de façon à évaluer si les deux protéines peuvent mimer les effets morphogénétiques induits par Pea3 dans ces cellules,
- inhiber l'expression de l'une ou l'autre des deux isoformes Cycline D2 dans les cellules TAC surexprimant ou non Pea3 et analyser leurs propriétés morphogénétiques, de façon à évaluer si les isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc participent aux effets morphogénétiques induits par Pea3.

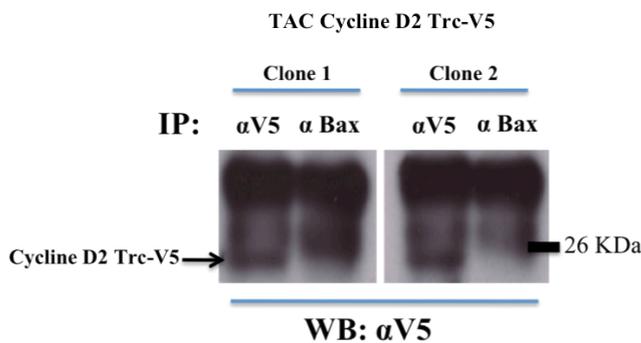
b.1-Cycline D2 et Cycline D2 Trc régulent les propriétés morphogénétiques des cellules TAC de façon opposée

Dans le but de savoir si les isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc peuvent induire les mêmes effets morphogénétiques que Pea3 nous avons choisi de surexprimer de façon stable et constitutive les isoformes Cycline D2 ou Cycline D2 Trc couplées à une étiquette V5 (nommées Cycline D2-V5 et Cycline D2 Trc-V5), dans les cellules TAC par sélection clonale (selon le protocole décrit dans la partie Matériels et méthodes). Deux clones ont pu être validés pour chaque isoforme par la technique de Western Blot associée ou non à une étape d'immunoprécipitation et l'utilisation d'un anticorps reconnaissant l'étiquette V5. Dans les deux clones Cycline D2-V5, nous avons pu montrer la présence d'un signal entre 34 et 43 kDa pouvant correspondre à l'expression de la protéine Cycline D2 fusionnée à l'étiquette V5 alors que l'analyse dans les cellules TAC pc-7 ne permet pas de détecter de signal spécifique (Figure 43A). Dans les deux clones Cycline D2 Trc-V5, la détection de la Cycline D2 Trc-V5 a nécessité au préalable une étape d'immunoprécipitation en utilisant l'anticorps anti V5. Suite à cette étape, par la technique de Western Blot un signal correspondant à une masse moléculaire légèrement inférieure à 26 kDa pouvant correspondre à l'expression de la protéine Cycline D2 Trc fusionnée à l'étiquette V5 a pu être détecté. L'utilisation d'un anticorps non relevant anti-Bax pour l'étape d'immunoprécipitation ne révèle pas de signal à environ 26 kDa par Western Blot, ce qui conforte le fait que le signal détecté suite à l'immunoprécipitation de l'étiquette V5 correspond à la protéine Cycline D2 Trc-V5 (Figure 43B.).

A.



B.



C.

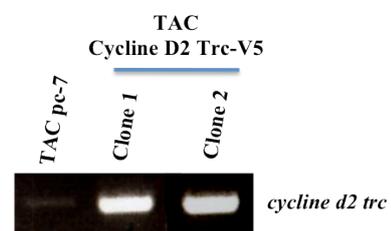


Figure 43. Analyse de l'expression des Cycline D2-V5 et Cycline D2 Trc-V5 Pea3 au niveau transcriptionnel et protéique. **A.** Analyse par Western Blot de l'expression de la Cycline D2-V5 dans les clones cellulaires TAC Cd2 1 et 2 et dans les cellules TAC pc-7 considérée comme témoin négatif de l'expression de la Cycline D2-V5. **B.** Analyse par Western Blot de l'expression de la Cycline D2 Trc-V5 dans les clones cellulaires TAC Cd2 Trc 1 et 2 suite à une étape d'immunoprécipitation en utilisant l'anticorps anti-V5 ou anti-Bax en témoin négatif d'immunoprécipitation. **C.** Validation de l'expression du transgene *cycline d2 trc-V5* par RT-PCR semi-quantitative en utilisant des oligonucléotides permettant l'amplification de l'ARN messenger *cycline d2 trc*.

Afin de conforter ces résultats nous avons analysé l'expression de l'ARN messenger *cycline d2 trc* dans les clones cellulaires TAC Cycline D2 Trc-V5 en parallèle du clone cellulaire témoin TAC pc-7, par une technique de RT-PCR semi-quantitative en utilisant un couple d'oligonucléotides permettant de détecter l'expression des transcrits *cycline d2 trc* endogènes ainsi que l'expression des transcrits *cycline d2 trc-V5* issus de l'expression du transgène (Figure 43C). Nous savons ainsi pu vérifier que les clones 1 et 2 expriment plus de transcrit *cycline d2 trc* que les cellules témoins TAC pc-7. Cette augmentation d'expression devant être due à l'expression du transgène dans nos cellules TAC, ce résultat conforte l'analyse de l'expression de la protéine Cycline D2 Trc-V5. Ainsi, nous avons pu valider deux clones cellulaires surexprimant la Cycline D2-V5 (nommés TAC Cycline D2-V5 clone 1 et clone 2) et deux clones surexprimant la Cycline D2 trc-V5 (nommés TAC Cycline D2 Trc-V5 clone 1 et clone 2).

Nous avons ensuite testé les capacités morphogénétiques de ces cellules, en trois dimensions dans un gel de collagène en les comparant aux cellules TAC pc-7, TAC Pea3-8 et avec ou sans ajout d'HGF. Le facteur morphogène HGF est utilisé ici comme témoin positif d'induction de la morphogenèse (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 1995). La Figure 44B illustre les résultats obtenus pour un des deux clones surexprimant l'une ou l'autre des isoformes Cycline D2 ou Cycline D2 Trc (les deux clones ont donné des résultats identiques). Ainsi la surexpression de la Cycline D2 Trc dans les cellules TAC leur confère la capacité d'envahir le gel et de former des structures organisées en tubules tout comme peuvent le faire Pea3 ou l'HGF, alors que les cellules TAC pc-7 seules en sont incapables (Figure 44). Au contraire l'isoforme Cycline D2 ne parvient pas à entraîner la formation de tubules dans le gel et diminue même l'effet de stimulation du HGF. Ces résultats montrent des effets antagonistes des deux isoformes de la Cycline D2 quant à la régulation des propriétés morphogénétiques des cellules TAC. L'isoforme Cycline D2 Trc-V5 semble jouer un rôle similaire à Pea3 pour le contrôle des capacités morphogénétiques des cellules TAC et l'isoforme Cycline D2-V5 semble jouer un rôle inverse à celui joué par Pea3, notamment lors de l'ajout de l'agent morphogène HGF.

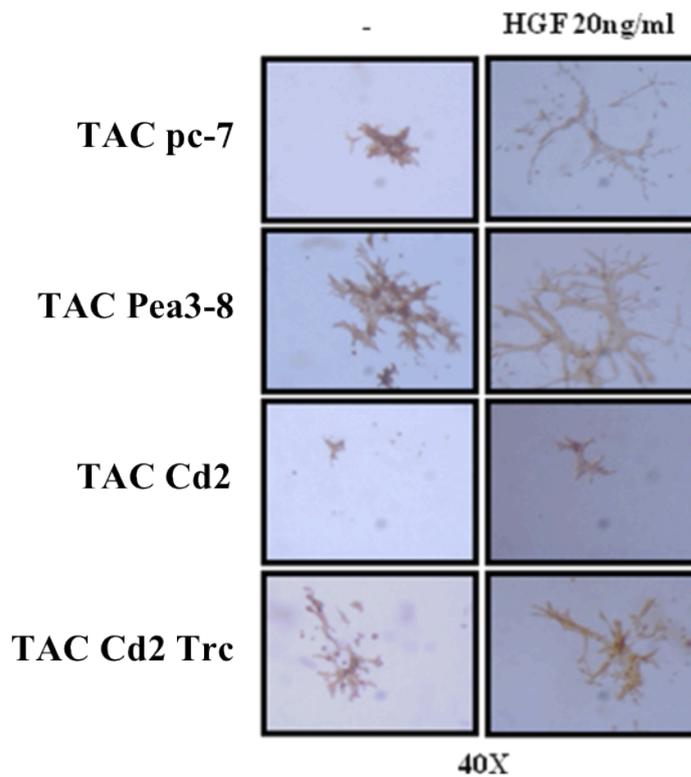


Figure 44. Etude des propriétés morphogénétiques des cellules TAC surexprimant les isoformes Cycline D2-V5 ou Cycline D2 Trc-V5. Les cellules surexprimant la Cycline D2-V5 (TAC Cd2), la Cycline D2 Trc-V5 (TAC Cd2 Trc) et les cellules TAC pc-7 et TAC Pea3-8 sont cultivées, pendant une semaine environ, dans un gel de collagène de type I reconstituant une matrice extracellulaire. L'ajout d'HGF à une concentration finale de 20 ng/ml permet d'induire la formation de tubules épithéliaux et est donc utilisé comme contrôle positif de morphogenèse.

b.2- Cycline D2, Cycline D2 Trc et Pea3 sont fonctionnellement liés dans les cellules TAC surexprimant Pea3

Afin de préciser l'implication des Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les effets induits par Pea3 dans les cellules TAC, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre les ARN messagers *cycline d2* (siRNA *cd2*) ou *cycline d2 trc* (siRNA *cd2trc*) (Figure 45). La validation de la fonctionnalité de ces siRNA a été réalisée après transfection transitoire dans les cellules TAC Pea3-8 et analyse de la quantité de transcrits *cycline d2* et *cycline d2 trc* par RT-PCR quantitative. Ainsi, 48 heures après le début de la transfection les siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc* permettent une répression de l'ordre de 90% et de 50% respectivement de l'expression des transcrits *cycline d2* et *cycline d2 trc* (Figure 45). Il est à noter que l'utilisation de six siRNA de séquences différentes et ciblant l'ARN messager *cycline d2 trc* n'a pas permis d'obtenir une répression plus conséquente que celle présentée ici c'est à dire 50%. Notre test permet aussi de vérifier la spécificité des séquences siRNA puisque le siRNA *cd2* n'induit pas de diminution de l'expression du transcrit *cycline d2 trc* et que le siRNA *cd2trc* n'induit pas de diminution de l'expression du transcrit *cycline d2* (Figure 45). L'analyse de la quantité de protéine suite à la transfection des siRNA a été analysée par Western blot en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement l'isoforme Cycline D2. De cette façon nous validons que le siRNA *cd2* permet la répression de l'expression de la protéine Cycline D2 alors que son expression ne varie pas dans la condition si RNA *cd2 trc* (Figure 46). L'expression de la protéine Cycline D2 Trc n'a pas pu être analysée faute d'anticorps fonctionnel entre nos mains.

i- Etude de l'implication des Cycline D2 et Cycline D2 Trc lors de la morphogenèse induite par le facteur de transcription Pea3

La surexpression de Pea3 dans les cellules TAC leur confère la capacité de faire de la morphogenèse de façon spontanée lorsqu'elles sont placées dans une matrice extracellulaire de collagène. Cet effet étant corrélé à une régulation directe de l'expression du gène *cycline d2* par Pea3 dans ces mêmes cellules, nous avons voulu savoir si les Cycline D2 et Cycline D2 Trc participaient à ce phénomène induit par Pea3. Pour cela nous avons placé les cellules TAC Pea3-8 transfectées avec un siRNA contrôle *versus* un siRNA *cycline d2* ou *cycline d2 trc* dans une matrice de collagène et analysé la capacité des cellules à faire de la morphogenèse.

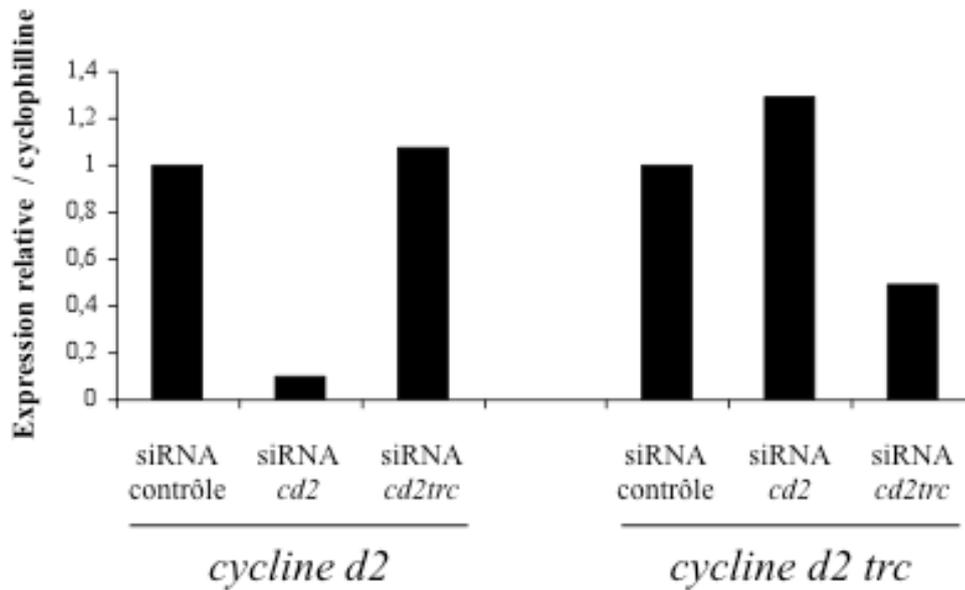


Figure 45. Analyse de l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* après transfection transitoire des siRNA *cd2* et siRNA *cd2 trc* dans les cellules TAC Pea3-8. Les cellules TAC Pea3-8 ont été transfectées avec les siRNA contrôle, siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc* et 48 heures après le début de la transfection l'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* a été analysée par RT-PCR quantitative. La quantification est exprimée en valeur relative d'ARN messagers de *cycline d2* ou *cycline d2 trc* normalisée par la quantité d'ARN messager du gène référent *cyclophiline*.

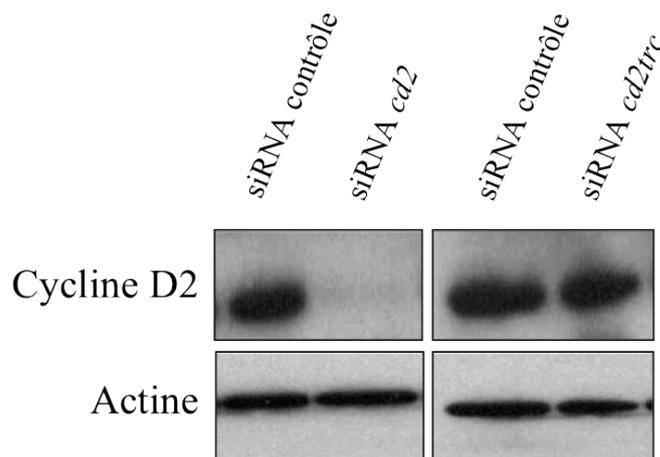


Figure 46. Analyse de l'expression de la protéine Cycline D2 après transfection transitoire des siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc* dans les cellules TAC Pea3-8. Les cellules TAC Pea3-8 ont été transfectées avec les siRNA contrôle, siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc*, 48 heures après le début de la transfection l'expression de la protéine Cycline D2 a été analysée par la technique de Western Blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine Cycline D2.

Après plusieurs tentatives nous n'avons pas été en mesure de tirer de conclusion quant à une implication de l'une ou l'autre des deux isoformes sur la morphogenèse induite par Pea3 dans le modèle TAC. En effet la transfection des siRNA constituant probablement un stress pour les cellules nous n'avons pas observé d'effet morphogénétique de Pea3 dans les cellules TAC Pea3-8 transfectées avec le siRNA contrôle et ne pouvons donc pas tirer de conclusion. Nous essayons donc actuellement d'optimiser les conditions d'expérimentation pour minimiser les effets délétères de la transfection afin de pouvoir statuer sur ce point important d'établissement du lien fonctionnel Pea3, morphogenèse et Cycline D2.

ii- L'inhibition des Cycline D2 et Cycline D2 Trc modifie la morphologie des cellules TAC surexprimant Pea3

Les cellules surexprimant Pea3 ayant une morphologie de type fibroblastique (Paragraphe I.2.a., Figure 27), nous avons voulu savoir si l'inhibition des Cycline D2 et Cycline D2 Trc pouvait modifier cet aspect. Pour cela nous avons observé la morphologie des cellules TAC Pea3-8 et Tac PLPCX Pea3-V5 par microscopie suite à la transfection des siRNA *cd2* et *cd2trc*. Ainsi, 48 heures après le début de la transfection les cellules TAC Pea3-8 ou TAC PLPCX Pea3-V5 dans lesquelles l'expression de la Cycline D2 est réprimée, possèdent une morphologie plus étirée que les cellules TAC Pea3-8 ou TAC PLPCX Pea3-V5 transfectées avec le siRNA contrôle (Figure 47). La répression de la Cycline D2 semble donc augmenter l'effet observé suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC. La répression de l'expression de la Cycline D2 Trc n'a quant à elle n'a pas d'effet marqué sur la morphologie des cellules TAC Pea3-8 ou TAC PLPCX Pea3-V5 (Figure 47).

Dans l'objectif de déterminer si les effets observés suite à la répression de la Cycline D2 sont dépendants de la surexpression du facteur de transcription Pea3, nous avons réalisé la même expérience dans le modèle cellulaire TAC pc-7. Ainsi, 48 heures après le début de la transfection le siRNA *cd2* entraîne une modification de l'aspect des cellules qui reste cependant moins marqué que lors de la transfection dans les cellules TAC Pea3-8 ou TAC PLPCX Pea3-V5 (Figure 47). Cet effet sur la morphologie des cellules TAC semble donc être pour partie dépendant de la présence de Pea3. En parallèle, la

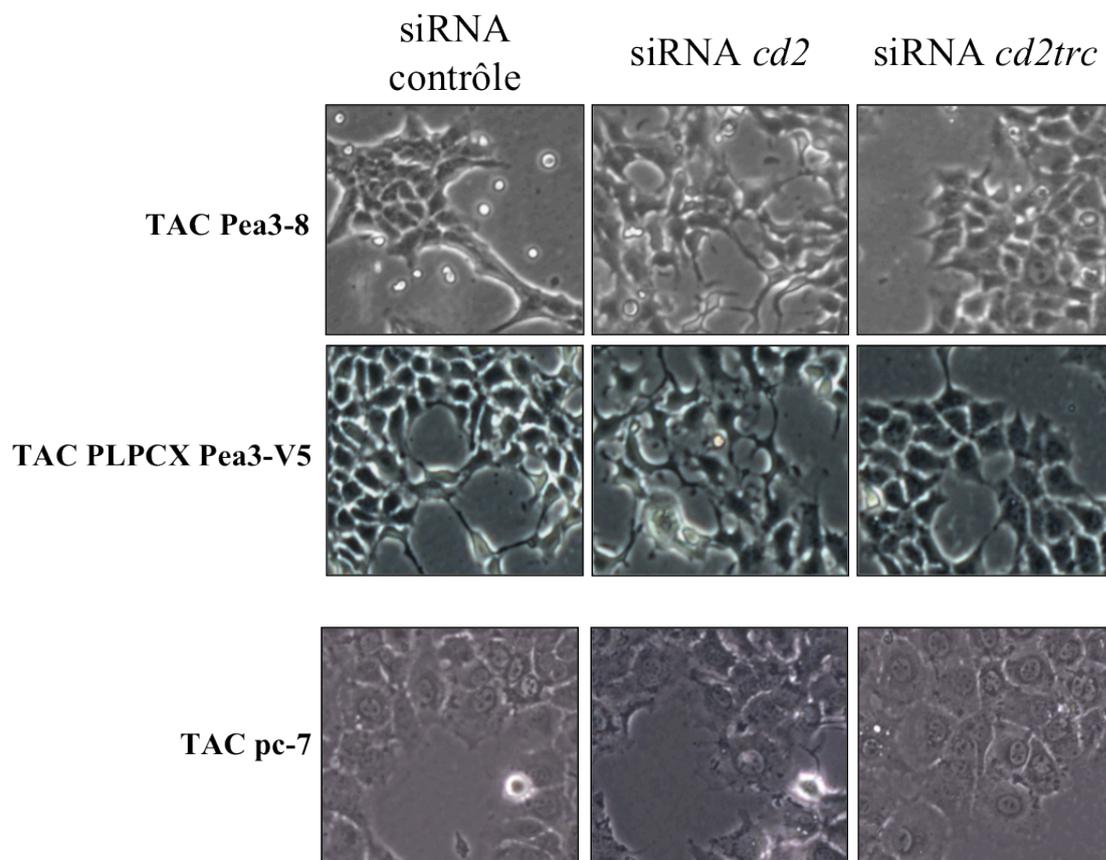


Figure 47. Observation de la morphologie des cellules TAC Pea3-8, TAC PLPCX Pea3-V5 et TAC pc-7, 48 heures après la transfection transitoire des siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc*. 48 heures après le début de la transfection les cellules sont analysées par microscopie optique. Grossissement X400.

répression de la Cycline D2 Trc n'a pas permis d'observer d'effet marqué sur la morphologie des cellules TAC pc-7 (Figure 47).

Il semblerait par conséquent que Pea3 et la Cycline D2 puissent interagir pour modifier la morphologie des cellules TAC. Nous ne pouvons par contre pas statuer sur l'effet de la Cycline D2 Trc dans ce contexte probablement de part le niveau moyen de répression transcriptionnelle obtenue et faute de ne pouvoir valider la répression de son expression au niveau protéique.

iii- Pea3 et Cycline D2 modulent les capacités de prolifération des cellules TAC

Les Cycline D2 et Cycline D2 Trc ont été décrites comme modulateurs de la prolifération cellulaire dans différents modèles cellulaires et tissus (Quelle *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2009). Concernant Pea3 il a été décrit que son inhibition dans des cellules cancéreuses mammaires pouvait diminuer leur capacité proliférative (Firlej, Ladam *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2007a). Cependant, nous ne disposons pas d'information concernant le rôle de Pea3 dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales mammaires TAC dans lesquelles sa surexpression entraîne une modulation de l'expression des Cycline D2 et Cycline D2 Trc. En prenant en considération ces différentes informations nous avons étudié les points suivants :

- l'influence de la surexpression de Pea3 sur le potentiel prolifératif des cellules TAC en effectuant un test de prolifération des cellules TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 en comparaison des cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX,
- la participation des Cycline D2 et Cycline D2 Trc au potentiel prolifératif des modèles de surexpression de Pea3 et des cellules témoins en réalisant un test de prolifération suite à la répression de l'une ou l'autre des deux isoformes.

L'analyse comparative des capacités de prolifération des cellules TAC pc-7, TAC Pea3-8, TAC PLPCX et TAC PLCPX Pea3-V5 a été entreprise par comptage des cellules toutes les 24 heures, de 48 heures à 96 heures après l'ensemencement des cellules. Les résultats sont présentés dans la figure 48 qui représente le nombre de cellules en fonction du temps.

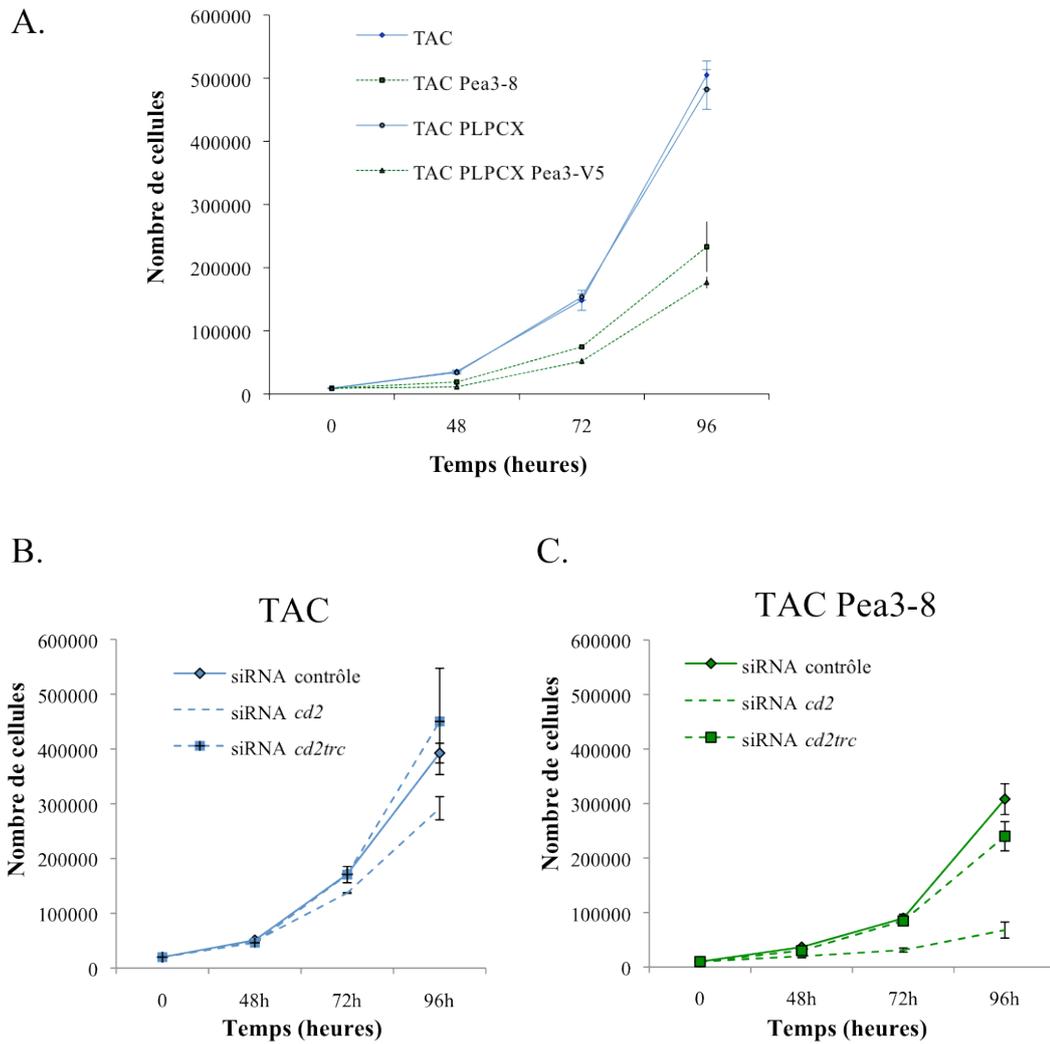


Figure 48. Analyse de la prolifération des modèles cellulaires TAC d'étude de Pea3 et des Cycline D2. La prolifération cellulaire a été évaluée par comptage des cellules 48, 72 et 96 heures après l'ensemencement des cellules. **A.** Evaluation de la prolifération des modèles cellulaires TAC pc7, TAC Pea3-8, TAC PLPCX et TAC PLPCX Pea3. **B.** Evaluation de la prolifération des modèles cellulaires TAC pc-7 et TAC Pea3-8 suite à l'inhibition de l'expression des Cycline D2 ou Cycline D2 Trc. Chaque graphique représente une expérience représentative de l'ensemble. L'écart type est calculé en considérant la valeur du triplicat de chaque condition expérimentale.

On observe de cette façon que les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 sont environ 2 fois moins nombreuses que les cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX après 48 heures de culture (Figure 48A). Cet effet est observé à tous les temps de l'expérience à savoir 72 heures et 96 heures après l'ensemencement des cellules. Ainsi la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC semble diminuer de moitié leur capacité à se diviser. Il semble donc Pea3 possède un effet négatif sur la prolifération des cellules épithéliales mammaires TAC.

Les Cycline D2 et Cycline D2 Trc pouvant moduler le potentiel prolifératif des cellules nous avons voulu tester l'importance de ces deux isoformes pour la prolifération des cellules TAC dans le contexte où Pea3 est surexprimé. Pour cela nous avons entrepris un test de prolifération par comptage suite à la répression de l'expression des Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les modèles cellulaires TAC pc-7 et TAC Pea3-8 (Figures 48B et 48C). Ainsi la répression de l'expression de la Cycline D2 Trc n'entraîne pas de modulation remarquable des capacités de prolifération que ce soit pour les cellules TAC pc-7 ou pour les cellules TAC Pea3-8 puisque les cellules transfectées avec le siRNA *cd2trc* prolifèrent aussi rapidement que les cellules transfectées avec le siRNA contrôle à 48, 72 ou 96 heures post transfection (Figure 48B). Ceci indique potentiellement, pour cette isoforme, une fonction indépendante de la fonction de régulation du cycle cellulaire décrite dans la littérature même si ce résultat est à prendre avec prudence puisque nous ne sommes pas en mesure de contrôler le niveau de répression de l'expression de la Cycline D2 Trc au niveau protéique et que le pourcentage d'inhibition au niveau transcriptionnel n'est que partiel. Concernant l'isoforme Cycline D2, sa répression entraîne une diminution du nombre de cellules TAC pc-7 de l'ordre de 20 % après 72 heures et de l'ordre de 30% après 96 heures de transfection par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle (Figure 48B). Dans les cellules TAC Pea3-8 la répression de l'expression de la Cycline D2 ralentit la prolifération des cellules de 50% après 72 heures et de 80% 96 heures après la transfection (Figure 48C). Ce résultat indique que la Cycline D2 est importante pour la prolifération des cellules TAC pc-7 et TAC Pea3-8. De plus, la surexpression de la Cycline D2 observée dans les TAC Pea3-8 ne semble pas pouvoir expliquer la diminution de prolifération observée suite à la surexpression de Pea3.

Ces résultats, qui nécessiteront d'être confirmés, permettent donc de montrer que Pea3 diminue la capacité de prolifération des cellules TAC mais que cet effet ne semble pas lié ou uniquement lié à la surexpression de la Cycline D2. Concernant l'implication de l'isoforme tronquée nous ne pouvons pas pour l'instant tirer de conclusion quant à son implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

iiii-La Cycline D2 régule l'expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse

En parallèle de l'analyse de la prolifération des cellules nous nous sommes intéressés à l'effet de la surexpression de Pea3 et de la répression des isoformes Cycline D2 sur la morphologie des cellules TAC. La modulation de la morphologie des cellules épithéliales vers une morphologie de type fibroblastique est notamment acquise au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce phénomène est crucial pour le développement de divers organes comme la glande mammaire et est aussi impliqué lors du processus de tumorigenèse (Thiery, 2002), cf Introduction, paragraphe I.3.b.). De plus différentes données disponibles dans la littérature indiquent que l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse peut être associée à une diminution du potentiel prolifératif, comme celui observé dans les cellules suite à la surexpression de Pea3 et l'inhibition de l'expression de la Cycline D2 (Mejlvang *et al.*, 2007; Sandhu *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 2004). La TEM est aussi caractérisée par la modulation, selon le type cellulaire, de l'expression de certains gènes comme les gènes *twist1*, *cripto1*, *zeb1*, *cdkn2b*, ou encore *snail*. Dans cette démarche, nous avons alors voulu déterminer si les effets sur la morphologie des cellules, induits par la surexpression de Pea3 avec ou sans inhibition de la Cycline D2, pouvaient être associés à l'expression de tels marqueurs.

Pour ce faire, dans une première approche, nous avons analysé par RT-PCR semi quantitative l'expression des gènes *mmp13*, *hgf*, *cripto1*, *twist1* et *cdkn2b* :

- dans les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 comparées aux cellules témoins TAC pc-7 et TAC PLPCX,
- dans les cellules TAC Pea3-8 transfectées avec le siRNA contrôle ou le siRNA *cd2* ainsi que le siRNA *cd2trc* malgré son manque d'effet sur la morphologie des cellules.

Le choix de ces gènes est fondé sur les informations suivantes : les gènes *mmp13*, *hgf* et *twist1* sont régulés par le facteur de transcription Pea3 dans divers modèles cellulaires et sont impliqués dans le contrôle des propriétés de migration notamment pendant la transition épithélio-mésenchymateuse (Ansieau *et al.*, ; Hellman *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2009). L'expression du gène *criptol* est induite lors de la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules NMuMG dont sont issues les TAC et son expression ectopique dans les cellules TAC entraîne des propriétés de cellules mésenchymateuses (di Bari *et al.*, 2009; Wechselberger *et al.*, 2001). Enfin, le gène *cdkn2b*, qui est retrouvé dans les analyses transcriptomiques réalisées dans le modèle TAC Pea3-8, voit son expression augmenter suite à l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales mammaires humaines HMEC, notamment suite à une stimulation par le TGF Bêta (Sandhu *et al.*, 1997).

Ainsi, l'expression des gènes *mmp13* et *cdkn2b* est respectivement augmentée et réprimée dans les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 par rapport aux cellules contrôles TAC pc-7 et TAC PLPCX (Figure 49A). L'expression des gènes *criptol*, *twist1* et *hgf* n'a pu être détectée ni dans les cellules TAC pc-7 ou TAC PLPCX, ni dans les modèles de surexpression de Pea3. Il semble donc que la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC ne soit pas suffisante pour induire l'expression de la plupart de ces gènes.

Dans le modèle cellulaire TAC Pea3-8, la répression de la Cycline D2 entraîne une augmentation de l'expression du gène *cdkn2b*, ce qui peut être corrélé à la diminution des capacités de prolifération des cellules TAC Pea3-8 suite à la répression de la Cycline D2 (Figure 49B). Elle permet aussi une induction de l'expression des gènes *hgf* et *criptol* et une augmentation de l'expression du gène *mmp13* dans les cellules TAC Pea3-8 (Figure 49B). Au contraire, l'expression du gène *twist1* n'a pas pu être détectée dans les différentes conditions testées. La fonctionnalité du couple d'oligonucléotides utilisé n'est pas en cause puisqu'elle peut être évaluée par amplification de l'ARN messager *twist1* dans les cellules transformées MMT utilisées en tant que témoin positif d'amplification (Figure 49B).

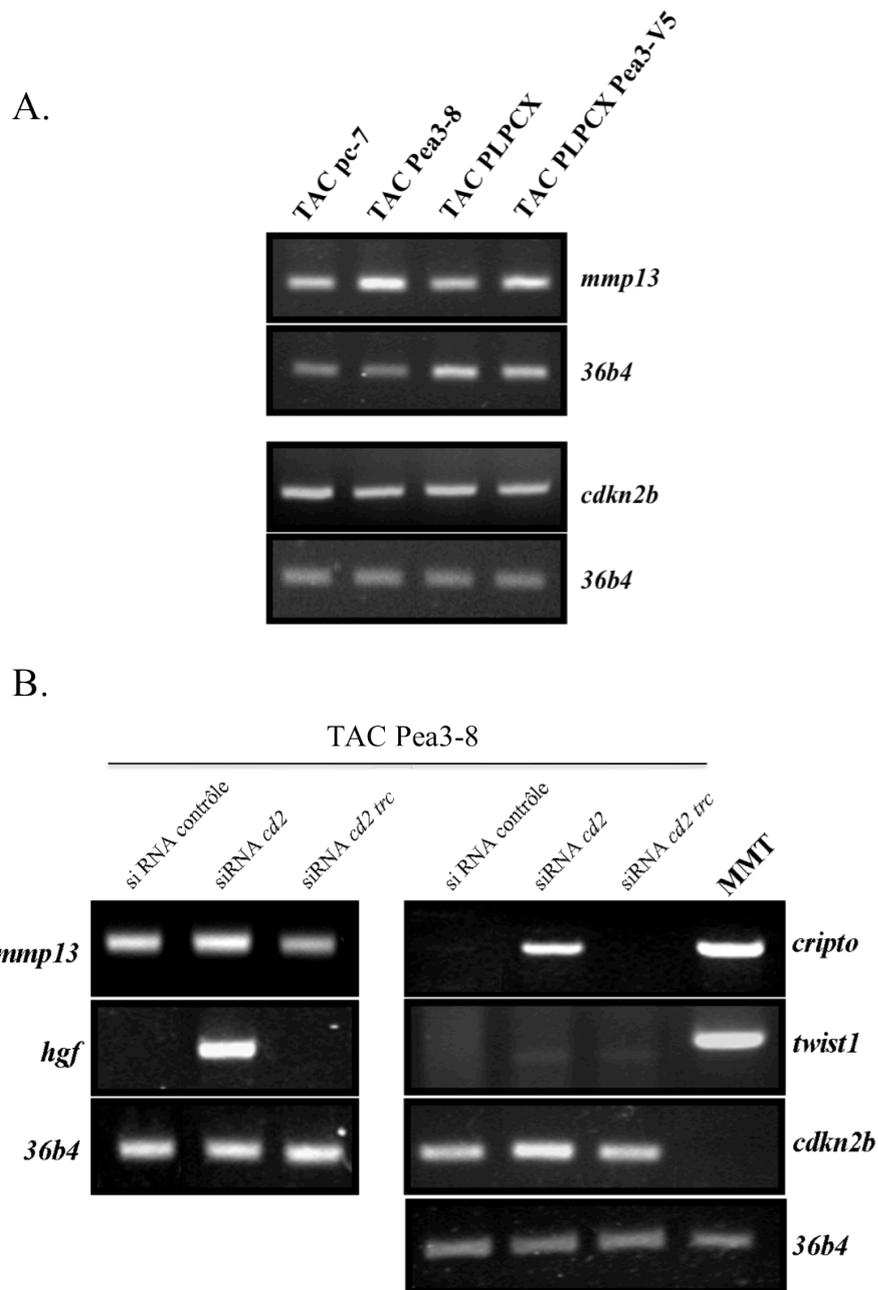


Figure 49. Analyse de l'expression des gènes marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse par RT-PCR semi quantitative. L'expression des gènes *mmp9*, *mmp13*, *hgf*, *cdkn2b* et *twist1* a été analysée par RT-PCR semi quantitative. **A.** Analyse dans les cellules TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 versus TAC pc-7 et TAC PLPCX. **B.** Analyse 48 heures après la transfection des siRNA contrôle, siRNA *cd2* ou siRNA *cd2trc* dans les cellules TAC Pea3-8. L'expression des gènes *cdkn2b* et *twist1* dans les cellules MMT est utilisée en tant que témoin négatif ou positif d'expression. Le gène *36b4* est utilisé en tant que gène référent.

En parallèle, la transfection du siRNA *cd2trc* dans les cellules TAC Pea3-8 n'induit pas de modification de l'expression des gènes *hgf*, *cripto1*, *twist1* ou *cdkn2b* (Figure 49B) elle permet par contre de réduire le niveau d'ARN messager *mmp13*.

Ces données indiquent que la Cycline D2 semble pouvoir interagir avec l'expression de gènes impliqués lors de la transition épithélio-mésenchymateuse. Si les résultats se confirment, la répression de son expression dans les cellules TAC Pea3-8 pourrait être un événement majeur pour l'expression de gènes impliqués dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. A l'inverse, tout en gardant à l'esprit que nous ne pouvons pas valider la répression de cette isoforme au niveau protéique, la Cycline D2 Trc ne semble pas majoritairement agir sur l'expression des gènes étudiés ici même si l'effet sur l'expression du gène *mmp13* indique qu'elle pourrait participer à l'induction de l'expression de ce gène par Pea3.

Afin de mieux caractériser l'état 'proche d'une transition épithélio-mésenchymateuse' des cellules TAC Pea3-8, nous vérifions actuellement l'expression d'autres marqueurs moléculaires caractéristiques de cet état comme les gènes *snail*, *vimentine*, *zeb1* ou encore l'expression de la protéine E-Cadherine. Les cellules ayant subi une TEM possédant des capacités de migration et d'invasion augmentées, nous testerons aussi les capacités de migration et d'invasion des cellules suite à la transfection des siRNA *cd2* et siRNA *cd2trc*. Nous envisageons aussi la même analyse de gènes dans les cellules TAC transfectées avec les différents siRNA, dans le but de savoir si les effets observés dans les cellules TAC Pea3-8 sont dépendants de la présence de Pea3.

2- Pea3, Cycline D2 et tumorigenèse mammaire

Les données obtenues précédemment suite à la surexpression de Pea3 et la surexpression ou l'inhibition des Cycline D2, ainsi que l'établissement d'un lien avec les mécanismes à la base de l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse permettent d'imaginer que les Cycline D2 et Cycline D2 Trc puissent intervenir lors du processus de tumorigenèse mammaire. Tenant compte de l'hypothèse de travail énoncée précédemment, nous avons entrepris l'analyse comparative de l'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans différents contextes pathologiques à savoir:

- dans les tumeurs formées par les TAC Pea3-8. En effet, ces cellules surexpriment les deux Cyclines D2 suite à la surexpression de Pea3 et sont pourtant capables de former des tumeurs *in vivo* (Paragraphe II.2.). Ces tumeurs constituent donc un bon modèle de l'analyse de l'expression des Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans un contexte de tumorigénèse mammaire.
- dans des échantillons de tumeurs du sein. En effet, l'inhibition de l'expression des ARN messager *pea3* et *cycline d2* dans les tumeurs du sein est déjà bien décrite dans la littérature, mais il n'existe pas de données concernant l'expression de l'ARN messager *cycline d2 trc*.

a. L'expression du gène cycline d2 est réprimée dans les tumeurs mammaires formées par les cellules TAC Pea3-8

Nous avons analysé, par RT-PCR quantitative, l'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans un échantillon de six tumeurs formées suite à l'injection des cellules TAC Pea3-8 dans des glandes mammaires de souris immunodéficientes (SCID) (Paragraphe II.2.). L'expression comparative de chacun de ces transcrits a aussi été analysée dans les cellules TAC pc-7 et TAC Pea3-8 cultivées *in vitro*. L'expression de chacun des gènes analysés est arbitrairement fixée à 1 dans les cellules TAC Pea3-8.

De cette façon nous pouvons noter que l'expression de *pea3* dans les tumeurs est assez variable. En effet dans 4 tumeurs sur les 6 analysées (tumeurs 1, 3, 5 et 6) l'expression de *pea3* est identique ou légèrement supérieure à celle observée dans les cellules TAC pea3-8 (Figure 50A). Au contraire, dans les tumeurs 2 et 4, l'expression de *pea3* semble légèrement inférieure à celle observée dans les TAC Pea3-8 mais elle reste cependant supérieure à l'expression mesurée dans les cellules TAC pc-7 (Figure 50A).

L'expression des ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans les tumeurs issues des cellules TAC Pea3-8 est au contraire plutôt homogène. Elle est en effet, par rapport à celle observée dans les cellules TAC Pea3-8, plus faible de 50 à 70% et de 60 à 80% pour les ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* respectivement (Figures 50B et 50C). Comparée aux cellules TAC pc-7, l'expression de l'ARN messager *cycline d2* est inférieure de 20 à 30% dans les tumeurs 1 à 6 alors que l'expression de l'ARN messager *cycline d2 trc* reste à peu près identique dans ces mêmes tumeurs (Figures 50B et 50C). Il

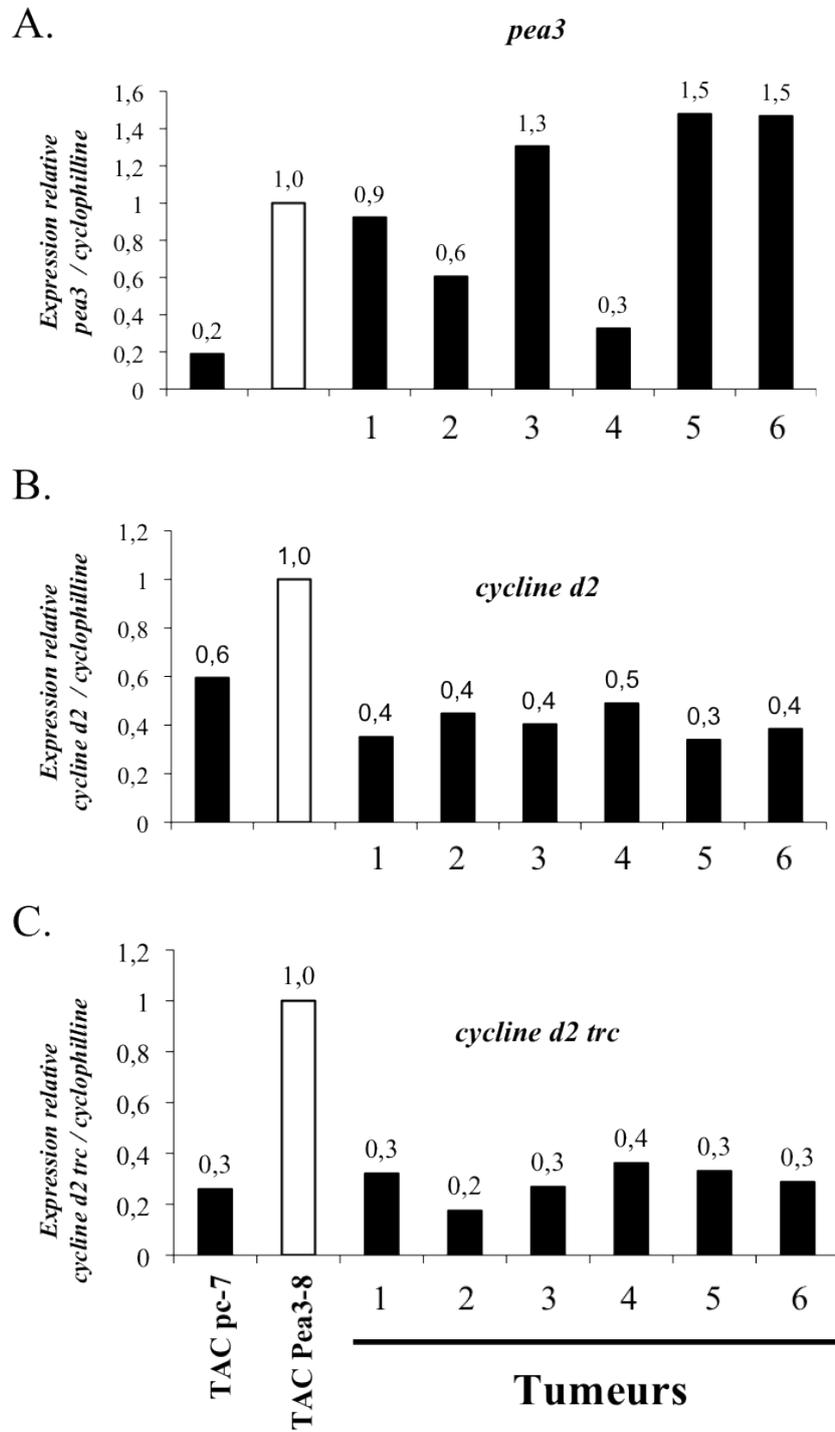


Figure 50. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des ARN messagers *pea3* (A), *cycline d2* (B) et *cycline d2 trc* (C) dans les tumeurs induites par les cellules TAC Pea3-8. L'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans six tumeurs issues de l'injection des cellules TAC Pea3-8 ainsi que dans les cellules TAC pc-7 est présentée relativement à l'expression dans les cellules TAC Pea3-8 cultivées *in vitro*, fixée arbitrairement à 1. Les valeurs d'expression de chaque ARN messager dans les différents échantillons sont indiquées sur le graphique. Les valeurs ont été normalisées par l'expression du gène référent *cyclophiline*.

apparaît donc que l'expression transcriptionnelle des deux transcrits *cycline d2* et *cycline d2 trc* diminue de façon similaire dans les tumeurs par rapport aux cellules TAC pc-7 et TAC Pea3-8.

En conclusion, dans ce contexte pathologique, l'expression de ces ARN messagers ne suit pas l'expression de l'ARN messenger *pea3* puisque les tumeurs exprimant le plus d'ARN messenger *pea3* expriment le moins d'ARN messenger *cycline d2* et *cycline d2 trc* (tumeurs 1, 3, 5 et 6). Cependant, ces résultats nous indiquent que l'expression des *cycline d2* et *cycline d2 trc* est réprimée dans les tumeurs par rapport aux cellules dont elles sont issues et que cette répression semble être un événement fréquent lorsque le statut tumoral est établi. Ce résultat est déjà observé dans le cancer du sein chez la femme pour le transcrit *cycline d2* (Evron *et al.*, 2001) et cf paragraphe ci après).

b. Les ARN messagers cycline d2 et cycline d2 trc semblent régulés de façon opposée dans les tumeurs du sein

Les ARN messagers extraits de neuf tumeurs du sein ont été obtenus par collaboration avec le docteur Denis Larsimont du centre Régis Bordet de Bruxelles. En test exploratoire, l'expression relative des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* a été évaluée par une technique de RT-PCR quantitative en comparant leur expression dans les tumeurs avec leur expression dans des cellules épithéliales mammaires humaines primaires (HMEC). L'expression de chaque gène est alors présentée comme son expression relative par rapport au niveau d'expression dans les cellules HMEC fixé arbitrairement à 1.

Cette technique nous permet d'observer un plus faible niveau d'expression des transcrits *cycline d2* dans 55% des tumeurs environ (5/9) (Figure 51B, tumeurs 4, 5, 6, 8 et 9) et une légère augmentation de son expression transcriptionnelle dans 45% des cas (4/9) (tumeurs 1, 2, 3 et 7). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature puisque l'expression de l'ARN messenger *cycline d2* est fréquemment réprimée dans les tumeurs du sein (Evron *et al.*, 2001) Fisher H *et al.*, 2002. L'ARN messenger *cycline d2 trc* est quant à lui fortement exprimé dans la totalité des échantillons (Figure 51C). Concernant *pea3*, son expression est plus faible dans 55% des cas (5/9) (tumeurs 2, 3, 4, 7 et 8) et une expression plus forte que dans les cellules HMEC est observée dans 33% des tumeurs environ (3/9) (tumeurs 1, 5 et 6) (Figure 51A).

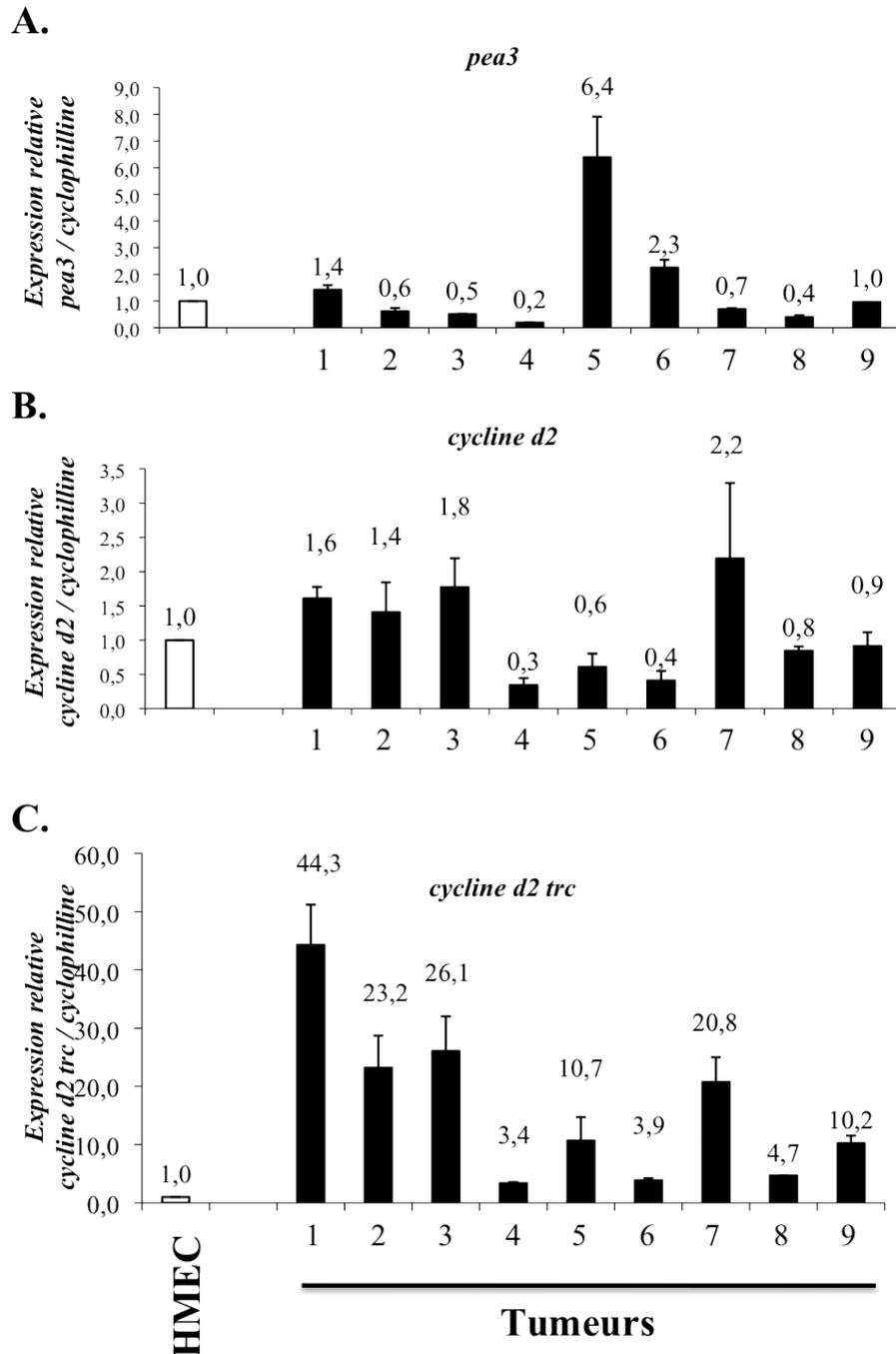


Figure 51. Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des ARN messagers *pea3* (A), *cycline D2* (B) et *cycline D2 trc* (C) dans des échantillons de tumeurs du sein. L'expression des ARN messagers *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans neuf tumeurs du sein est présentée relativement à l'expression dans le témoin cellulaire HMEC fixé arbitrairement à 1. Les valeurs d'expression de chaque ARN messager dans les différents échantillons sont indiquées sur le graphique. Les valeurs ont été normalisées par l'expression du gène référent *cyclophiline*.

Il semble donc que les données d'expression de l'ARN messager *cycline d2* soient corrélées aux informations disponibles dans la littérature et dans une moindre mesure aux résultats obtenus dans les tumeurs formées par les cellules TAC Pea3-8. L'expression de l'ARN messager *cycline d2 trc* est quant à elle augmentée ce qui fait de la Cycline D2 Trc un potentiel acteur pro-tumorigène. Nous pouvons aussi noter que le résultat concernant l'expression de l'ARN messager *cycline d2 trc* n'est pas corrélé aux données obtenues dans les tumeurs formées par les cellules TAC Pea3-8, ce point sera discuté dans la partie discussion. Pour l'instant dans ces neuf échantillons nous n'avons pu mettre en évidence de corrélation avec le statut d'expression de *pea3*. Il apparaît même que les tumeurs exprimant les niveaux d'ARN messager *pea3* les plus élevés (tumeurs 5 et 6) expriment les niveaux d'ARN messagers *cycline d2* et *cycline d2 trc* les plus faibles, l'expression de la *cycline d2* étant même réprimée.

Ces données restent préliminaires et nécessitent donc d'être confortées par une analyse plus exhaustive. Pour cela nous avons obtenu, en collaboration avec le docteur Denis Larsimont du centre Régis Bordet, un échantillon de 80 tumeurs du sein avec des paramètres clinico-pathologiques bien définis comme le statut d'expression du récepteur aux œstrogènes ERalpha ou la présence de métastases associées. Nous allons donc pouvoir entreprendre l'analyse l'expression de *pea3* et des *cycline d2* et *cycline d2 trc* dans ces tumeurs et déterminer s'il existe une corrélation d'expression entre ces trois transcrits. Nous pourrons aussi associer ces données d'expression aux critères clinico-pathologiques dont nous disposerons.

Cette étude de la fonction du gène *cycline d2* permet de mieux comprendre comment le facteur de transcription Pea3 influence les événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Nous nous efforçons actuellement de préciser l'implication du gène *cycline d2* dans ce contexte par des tests phénotypiques et des analyses moléculaires. La stratégie employée pour l'étude du gène *cycline d2* présentée précédemment est employée plus généralement au sein de l'équipe pour l'étude de gènes ciblées lors des analyses transcriptomiques et qui nous permettront de mieux apprécier comment Pea3 intervient dans les processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.

VII. Exploitation des données issues des analyses transcriptomiques – Pertinence pour l'étude du facteur de transcription Pea3

Avec les analyses transcriptomiques que nous avons réalisées et qui sont présentées dans le paragraphe IV.2., il est possible d'obtenir une vue d'ensemble des modifications du transcriptome des cellules suite à la modulation de l'expression de Pea3 dans les cellules TAC ou MMT. La régulation des propriétés cellulaires comme la prolifération ou la migration est assurée par des ensembles de gènes capables d'interagir fonctionnellement et qui sont alors organisés en réseaux. Etudier la fonction de Pea3 en considérant les réseaux de gènes qu'il pourrait réguler devrait apporter plus d'informations que l'étude d'un gène cible unique, comme nous le faisons actuellement avec le gène *cycline d2*, pour comprendre comment Pea3 régule les propriétés de prolifération, de migration ou encore d'invasion cellulaires. Afin de tester cette hypothèse nous avons considéré les données d'analyses transcriptomiques de façon globale grâce à l'utilisation d'un outil bio-informatique, le logiciel d'analyse Ingenuity Pathways Analysis® (IPA). Ce logiciel analyse les listes de gènes obtenues lors des expériences de puces à ADN et les organise en réseaux moléculaires. Un réseau moléculaire peut être défini comme une représentation graphique des liens fonctionnels entre des gènes ou les produits de ces gènes (ARN et protéines). Les gènes ou leurs produits sont alors symbolisés par des formes géométriques et les liens fonctionnels entre ces différents gènes ou produits de ces gènes sont représentés par des flèches. Chaque flèche est la représentation d'au moins une observation fonctionnelle décrite dans la littérature et disponible dans la base de donnée du logiciel IPA. Les flèches pleines indiquent une interaction fonctionnelle physique et directe, comme deux protéines d'un même complexe protéique. Les flèches en pointillés indiquent qu'il n'y a pas d'interaction fonctionnelle directe répertoriée dans la littérature (adapté de (Naga Prasad *et al.*, 2009).

Ainsi nous avons analysé les listes de gènes obtenues suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC ou suite à son inhibition dans les cellules MMT. Pour ce faire nous avons considéré les gènes ayant une valeur $p < 0,1$, c'est-à-dire dont la probabilité d'être régulés est de 90%. Ce critère permet d'augmenter le nombre de gènes disponibles pour l'analyse, ce qui se prête mieux à une analyse globale. En effet en appliquant ce critère nous obtenons 993 gènes régulés suite à la surexpression de Pea3 dans le modèle

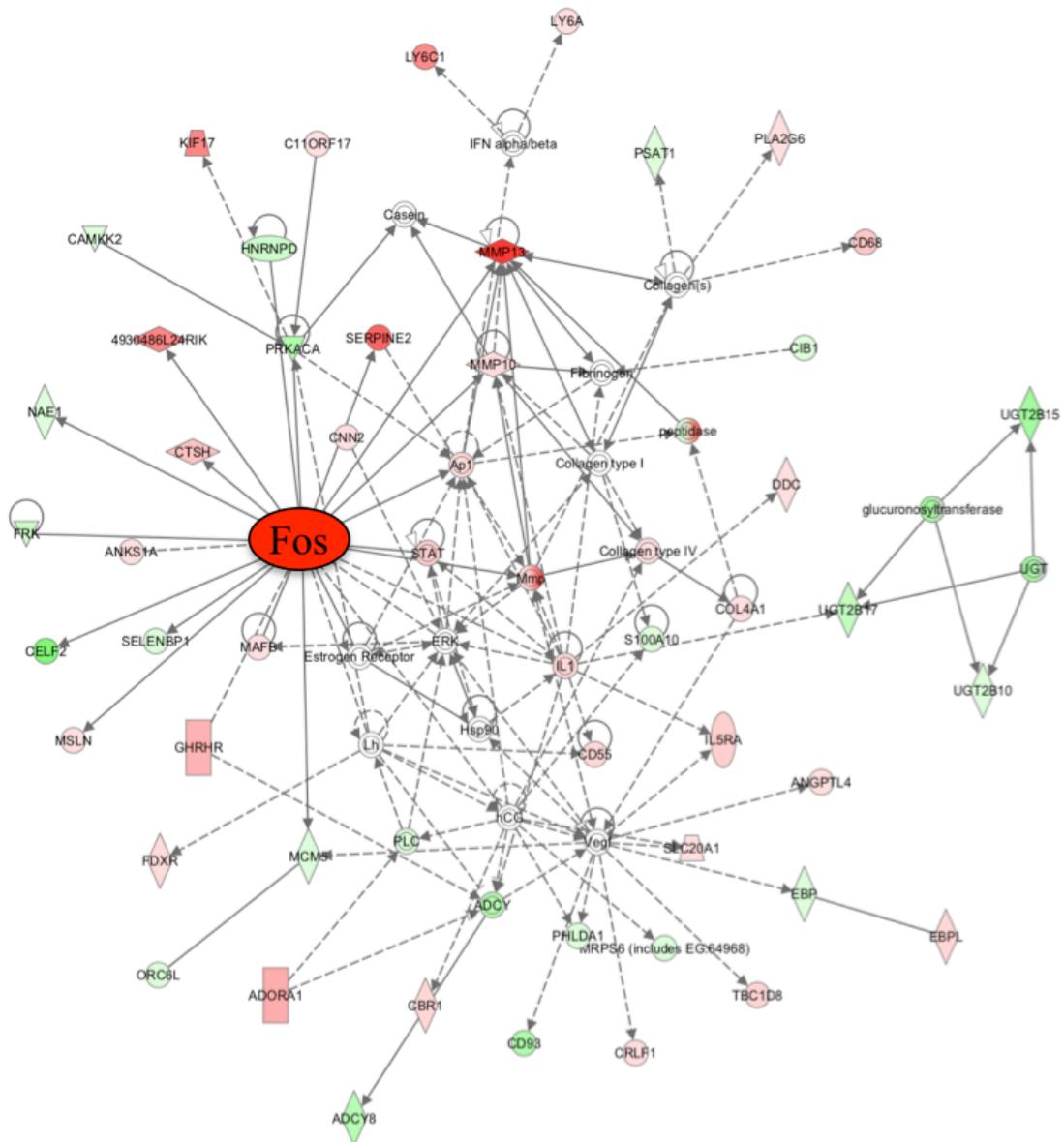


Figure 52. Schéma représentant le réseau moléculaire « Morphologie des tissus » identifié dans les cellules TAC Pea3-8 par l'analyse avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Chaque gène impliqué dans le réseau est représenté par une forme géométrique. Les gènes représentés en blanc ne sont pas régulés par Pea3 dans notre analyse. Les gènes représentés en vert ou en rouge sont respectivement les gènes dont l'expression est diminuée ou réprimée suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC. Les flèches pleines symbolisent les interactions directes entre deux gènes ou produits de gènes, les flèches en pointillés représentent des interactions indirectes entre deux gènes ou produits de gènes.

TAC et 379 gènes dont l'expression est modulée suite à la répression de Pea3 dans le modèle MMT.

J'ai choisi ici de représenter quelques réseaux moléculaires en fonction de la pertinence des fonctions biologiques qui leur est associée et des gènes les composant, par rapport aux données dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature concernant le rôle de Pea3, notamment lors des événements de prolifération, de migration et d'invasion contrôlant les processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.

Ainsi, dans le modèle TAC, lorsque les gènes régulés par Pea3 sont entrés dans le logiciel IPA, ils s'organisent en divers réseaux dont certains sont impliqués dans le contrôle de la « **Morphologie des tissus** » et les étapes du « **Développement embryonnaire** ». Dans le modèle cellulaire MMT, les gènes dont l'expression est régulée suite à la répression de l'expression de Pea3 s'organisent en un réseau impliqué notamment dans le contrôle du « **Cycle cellulaire** ». Ces différents réseaux sont développés ci après.

1- Pea3 et le réseau moléculaire «Morphologie des tissus»

Ce réseau moléculaire présenté en figure 52 comprend 49 gènes dont l'expression varie suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC. On observe parmi les gènes composant ce réseau la présence du gène *mmp13* dont nous avons au préalable validé la régulation par Pea3 dans les cellules TAC (Figure 29). De plus, cette représentation graphique met en avant le gène *fos* dont l'expression est augmentée d'un facteur 2,8 ($p < 0,02$) suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC. Il est à noter aussi dans ce réseau, que Fos en plus de voir son expression augmenter suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC est potentiellement capable d'interagir avec de nombreux gènes dont l'expression est aussi régulée suite à la surexpression de Pea3 dans le modèle TAC. C'est le cas des gènes *mmp13*, *serpine2*, et *mmp10*. La protéine Fos est un facteur de transcription faisant partie du complexe protéique AP1 avec lequel le facteur de transcription Pea3 interagit pour réguler l'expression de nombreux gènes cibles comme le gène *cox2* pendant la tumorigenèse mammaire (Subbaramaiah *et al.*, 2002). Cette analyse indique que la protéine Fos, et donc potentiellement le complexe AP1, pourrait jouer un

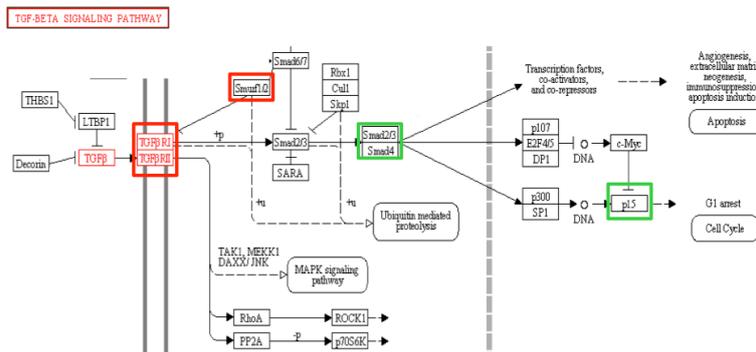
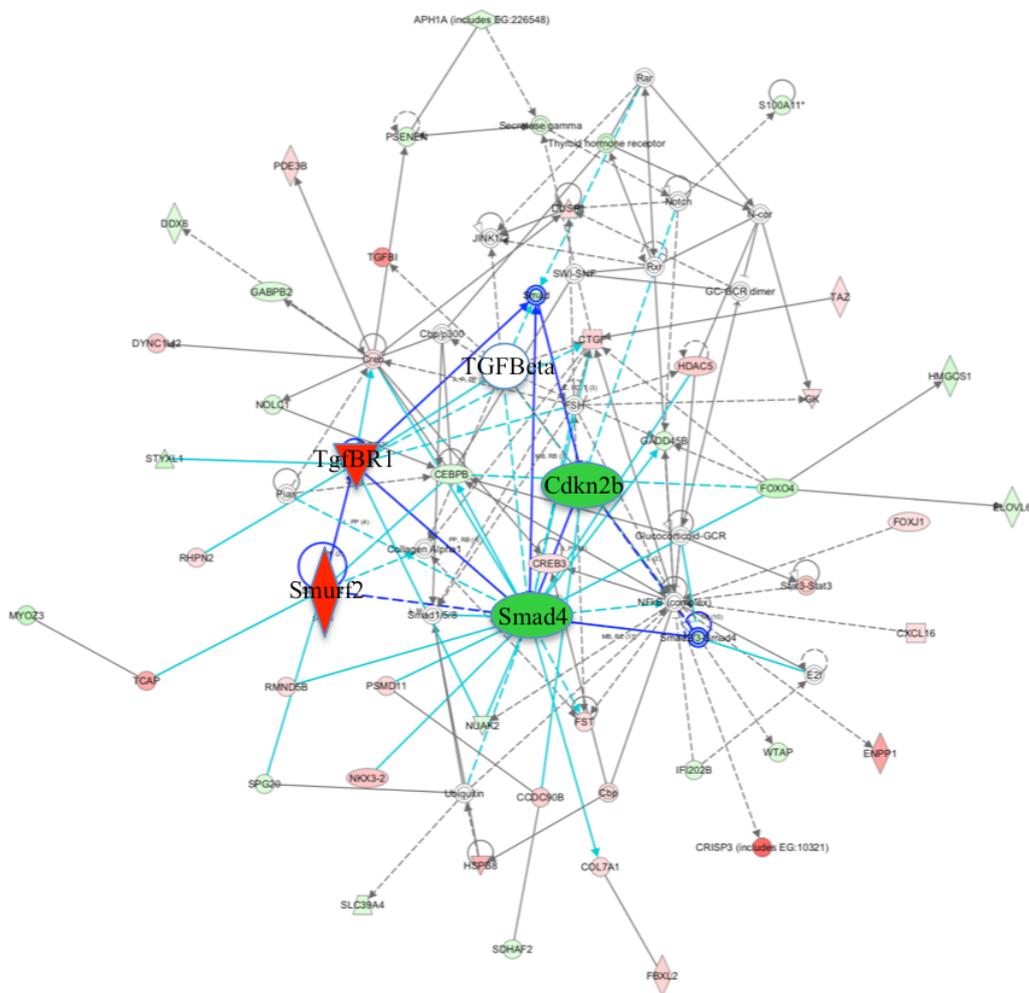


Figure 53. Schéma représentant le réseau moléculaire « Développement embryonnaire » identifié dans les cellules TAC Pea3-8 par l'analyse avec le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA) et mise en évidence de la voie du TGF Bêta. A. Chaque gène impliqué dans le réseau est représenté par une forme géométrique. Les gènes représentés en blanc ne sont pas régulés par Pea3 dans notre analyse. Les gènes représentés en vert ou en rouge sont respectivement les gènes dont l'expression est diminuée ou réprimée suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC. Les flèches pleines symbolisent les interactions directes entre deux gènes ou produits de gènes, les flèches en pointillés représentent des interactions indirectes entre deux gènes ou produits de gènes **B.** Schéma représentant la voie de signalisation du TGF Bêta et la position des molécules dont l'expression est régulée par Pea3. Les carrés rouge et vert indiquent respectivement les gènes dont l'expression est augmentée ou réprimée suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC.

rôle important pour les effets morphogénétiques induits par le facteur de transcription Pea3 dans les cellules TAC.

2- Pea3 et le réseau de gènes « Développement embryonnaire »

Ce réseau présenté en figure 53A comprend 46 gènes dont l'expression est régulée par Pea3. Parmi ceux ci aucun n'a pu être précédemment mis en évidence, dans la littérature, comme gène cible de Pea3. Différents acteurs de ce réseau n'ont pas leur expression régulée suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC mais sont décrits pour interagir avec d'autres membres du réseau qui sont régulés par Pea3 dans notre analyse. C'est le cas de protéines composant le complexe de transcription NFkB ou encore le facteur de transcription CebpB. L'analyse par le logiciel indique aussi de façon remarquable que Pea3 régule l'expression de plusieurs gènes de la voie du TGF Bêta. Parmi les gènes de la voie TGF Bêta nous notons la présence des gènes :

- ***tgfbr1*** codant un récepteur au TGF Bêta, son expression est augmentée d'un facteur 2,06 suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules épithéliales mammaires TAC ($p=0,012$) (Bierie and Moses, 2006),
- ***smad4***, codant un facteur de transcription, Smad4, qui représente un acteur majeur de la voie du TGF Bêta. Les protéines Smad sont connues pour réguler l'expression des gènes cibles de la voie TGF Bêta. Smad4, quant à lui, inhibe l'expression transcriptionnelle du gène *e-cadherine* suite à la stimulation des cellules NMuMG par le TGF Bêta (Vincent *et al.*, 2009). Dans notre analyse, son expression est réprimée de 70% ($p=0,1$),
- ***smurf2***, codant la protéine Smurf2, une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation des récepteurs au TGF Bêta et des protéines Smad. L'expression du gène *smurf2* est augmentée environ 14,5 fois suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC ($p=0,05$) (Izzi and Attisano, 2004),
- ***cdkn2b***, gène cible de la voie TGF Bêta. La protéine Cdkn2b (p15INK4b) contrôle l'arrêt de croissance des cellules épithéliales mammaires suite à une stimulation par le TGF Bêta.

Son expression est réprimée de 94% dans les cellules TAC Pea3-8 ($p=2.10^{-4}$) (Sandhu *et al.*, 1997).

La position des différentes protéines codées par ces gènes dans la voie de signalisation du TGF Bêta est représentée dans la Figure 53B.

Ces différentes molécules peuvent interagir avec les autres gènes régulés par Pea3 qui sont présents dans le réseau. Il se peut donc que Pea3 module l'activité de la voie TGF Bêta par la régulation de l'expression de molécules capables de moduler l'activité de cette voie.

3- Pea3 et le réseau de gènes « Cycle cellulaire »

Ce réseau moléculaire présenté en figure 54 regroupe 26 gènes régulés suite à la répression de Pea3 dans les cellules MMT. Ce réseau est centré sur trois grands acteurs impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules : le produit du gène *nfk2*, le produit du gène *hdac1* et le produit du gène *e2f4*. L'expression des gènes *e2f4*, *hdac1* et *nfk2* est respectivement régulée d'un facteur 0,64 ($p=0,07$), 0,87 ($p=0,02$) et 1,7 ($p=0,05$) suite à la répression de l'expression de Pea3 dans les cellules MMT. De part leur fonction de régulateur, notamment de la prolifération cellulaire, les produits des gènes *nfk2*, *hdac1* et *e2f4* sont impliqués dans la progression de nombreux cancers (Chen *et al.*, 2009; Rayet and Gelinas, 1999).

Compte tenu de l'effet de la répression de Pea3 sur la prolifération des cellules MMT et leur potentiel tumorigène, ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre comment Pea3 peut moduler cette propriété morphogénétique lors du processus de tumorigenèse mammaire.

L'étude globale des listes de gènes cibles obtenues grâce aux analyses transcriptomiques dans les modèles TAC et MMT suite à la modulation de l'expression de Pea3, a ainsi permis de pointer différents acteurs moléculaires pouvant agir de concert avec Pea3 pour réguler les processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Parmi ces acteurs nous avons plus spécifiquement remarqué la voie du TGF Bêta et les facteurs de transcription Fos, NfκB et E2F4. Même si cette analyse n'a pas la prétention

d'expliquer tous les événements moléculaires se mettant en place lors de la modulation de l'expression de Pea3 dans nos modèles d'étude TAC et MMT et même si les résultats exposés dans ce chapitre n'auront de valeur que lorsqu'ils auront pu être validés expérimentalement, notre analyse offre de nouvelles perspectives de recherche que nous ne pouvions pas imaginer en étudiant individuellement les gènes régulés par Pea3.

Au laboratoire nous nous intéressons à comprendre le rôle des facteurs de transcription du groupe PEA3 lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Pour ce faire, préalablement à mon travail de thèse, des modèles cellulaires de morphogenèse mammaire (cellules TAC) et de tumorigenèse mammaire (cellules MMT) dans lesquels l'expression de ces facteurs de transcription est modulée ont été établis (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003; Firlej, Ladam *et al.*, 2008). A partir de ces modèles plusieurs lignes de recherche complémentaires ont été et sont développées:

- Etudier les propriétés morphogénétiques et tumorigéniques *in vitro* et *in vivo* de ces modèles cellulaires suite à la modulation de l'expression de Pea3 ou Erm.
- Rechercher les mécanismes moléculaires impliqués en réalisant des analyses transcriptomiques permettant de déterminer les gènes dont l'expression est régulée par ces facteurs dans les modèles cellulaires TAC et MMT.

Ainsi, préalablement à mes travaux de thèse, l'étude de l'implication des facteurs de transcription Pea3 et Erm dans les propriétés morphogénétiques des cellules épithéliales mammaires TAC a été entreprise par une technique de surexpression stable et constitutive de ces facteurs (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Cette stratégie a été envisagée après avoir observé que l'expression de ces facteurs est localisée dans le tissu épithélial de la glande mammaire pendant la puberté, étape de développement intense de l'arbre épithélial par morphogenèse de branchement (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Il a alors été montré que les cellules TAC surexprimant Pea3 (TAC Pea3-8) ou Erm (TAC Erm1) présentent des capacités de migration et d'invasion supérieures aux cellules témoins, les cellules TAC pc-7. La surexpression de ces facteurs leur confère aussi la capacité de faire de la **morphogenèse** de branchement de façon spontanée lorsqu'elles sont placées dans une matrice de collagène, mimant ainsi le comportement des cellules TAC lorsqu'elles sont stimulées par un facteur de croissance comme l'HGF.

Pea3 et Erm participent donc à la régulation des propriétés morphogénétiques des cellules épithéliales mammaires et sont donc potentiellement des acteurs de la morphogenèse mammaire.

Ce résultat a été précisé depuis par Kurpios et collaborateurs qui ont montré que l'inhibition de l'expression de Pea3 chez la souris entraînait des défauts de formation de l'arbre épithélial pendant la puberté et la gestation (Kurpios *et al.*, 2009). Ces défauts

seraient dus à un problème de différenciation des cellules progénitrices de l'arbre épithélial résultant en une accumulation de cellules en prolifération.

En parallèle, l'aspect **tumorigénèse** a été abordé par l'étude des propriétés tumorigéniques *in vitro* et *in vivo* des cellules MMT suite à la répression de l'expression de Pea3 ou Erm par la technique d'interférence à l'ARN. Ainsi, l'effet de la répression de ces facteurs de transcription sur les capacités de prolifération, de migration et d'invasion *in vitro* des cellules MMT, ainsi que sur leur potentiel tumorigène après injection en souris immunodéprimées a donc été entreprise.

Enfin, la recherche des gènes dont l'expression est régulée par Pea3 dans les modèles TAC et MMT a été entreprise en plusieurs étapes, tout d'abord une première analyse permettant d'étudier l'expression d'un petit nombre de gènes, réalisée dans les cellules TAC dans lesquelles différents gènes régulés par le facteur Erm ont pu être mis en évidence dont le gène *cycline d2*. Une deuxième analyse transcriptomique cette fois-ci plus globale a été initiée dans le modèle MMT suite à la répression de Pea3 ou Erm.

Pendant ma thèse je me suis focalisé sur le facteur de transcription Pea3 pour lequel nous disposons du plus grand nombre d'outils. En tenant compte de toutes les données disponibles au laboratoire, nous avons donc envisagé de développer les thèmes suivants:

- Etudier le comportement *in vivo* des cellules TAC Pea3-8 après injection dans une glande mammaire désépithélialisée,
- Participer à l'étude du rôle du facteur de transcription Pea3 dans les propriétés tumorigéniques des cellules MMT, par des approches *in vitro* et *in vivo*,
- Rechercher les mécanismes moléculaires régulés par Pea3 en effectuant des analyses transcriptomiques dans les cellules TAC et MMT dans lesquelles l'expression de Pea3 est modulée.
- Parmi les cibles moléculaires, le gène *cycline d2* a été identifié. L'étude de la caractérisation de sa régulation par Pea3 ainsi que de sa fonction dans les événements induits par Pea3 a été entreprise.

I. Etablissement de modèles cellulaires TAC complémentaires pour l'étude du rôle de Pea3

Les travaux réalisés au cours de ma thèse s'appuient entre autre sur l'utilisation du modèle cellulaire TAC duquel a été dérivé un clone nommé TAC Pea3-8, ayant intégré de façon stable et constitutive un plasmide d'expression permettant la surexpression de Pea3 (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Connaissant les problèmes posés par l'utilisation de population cellulaires clonales nous avons entrepris de générer une nouvelle lignée de cellules TAC surexprimant Pea3, dans l'idée de valider les résultats obtenus dans le modèle TAC Pea3-8 notamment par une approche en contexte *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé une infection rétrovirale permettant l'intégration de façon aléatoire et stable dans le génome des cellules d'un plasmide d'expression codant Pea3. Les cellules ainsi obtenues ont été nommées TAC PLPCX Pea3-V5 et TAC PLPCX pour les cellules témoins.

Lors de ces expériences nous avons pu observer que les rétrovirus codant Pea3, PLPCX Pea3-V5 entraînaient un niveau important de mort cellulaire parmi les cellules infectées alors que cet effet délétère n'était pas observé dans les cellules infectées avec le rétrovirus témoin PLPCX. De plus, en comparant l'expression de Pea3 dans les cellules en cours de sélection et dans la population cellulaire établie nous avons remarqué que les cellules en cours de sélection exprimaient un niveau de transcrits *pea3* nettement plus conséquent et détectable par Western Blot alors que l'expression de la protéine Pea3 dans les cellules établies n'est pas analysable. Il semblerait donc que le niveau d'expression de Pea3 puisse être lié au pouvoir délétère observé suite à l'infection des cellules TAC avec le rétrovirus PLPCX Pea3-V5. En accord avec cette idée nous n'avons pas été en mesure de détecter l'expression de la protéine Pea3 dans le clone cellulaire TAC Pea3-8.

Nous avons alors entrepris de valider l'apport de la fonction du facteur de transcription Pea3 dans les cellules TAC PLPCX Pea3-V5 et TAC Pea3-8 en comparaison, en analysant l'expression de certains gènes décrits dans la littérature et au laboratoire pour être régulés par Pea3. Par cette technique nous avons alors montré que Pea3-V5 dans nos cellules TAC PLPCX Pea3-V5 pouvait augmenter l'expression des gènes *mmp13* et *mmp9* tout comme semble le faire la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC Pea3-8. Nous

disposons alors de deux lignées cellulaires surexprimant le facteur de transcription Pea3, qui semble fonctionnel puisqu'il régule l'expression de certains des gènes cibles décrits.

Nous testons actuellement le comportement de ces cellules dans un gel de collagène afin de déterminer si elles peuvent former des tubes épithéliaux de façon spontanée comme le font les cellules TAC Pea3-8.

Enfin, il est nécessaire de préciser que cette stratégie a été maîtrisée tardivement au laboratoire et nous n'avons donc pas été en mesure de mener toutes les expériences présentées dans le manuscrit de thèse en considérant les modèles TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5 en parallèle.

II. Pea3 module les propriétés morphogénétiques des cellules épithéliales mammaires normales et transformées

Au cours de ma thèse, dans le but de déterminer l'impact de la surexpression de Pea3 dans un contexte physiologique de développement de la glande mammaire, nous avons testé le comportement des cellules TAC Pea3-8 après injection dans une glande mammaire désépithélialisée de souris SCID. Lors de ces expériences nous nous sommes aperçus que les souris dans lesquelles les cellules TAC Pea3-8 étaient injectées développaient des tumeurs au niveau du site d'injection et formaient des tumeurs secondaires au niveau des poumons. Ces résultats ont pu être réitérés au cours de trois expériences indépendantes. Les cellules témoins quant à elle n'ont formé des tumeurs que dans une expérience, très tardivement par rapport aux cellules TAC Pea3-8 et sans qu'aucune métastase ne puisse être observée dans les organes des souris.

Ces résultats indiquent donc que la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC leur confère un potentiel tumoral lorsqu'elles sont placées dans le contexte d'une glande mammaire. De plus, les tumeurs se développant forment des métastases, ce qui indique que les cellules de ces tumeurs ont la capacité d'envahir les tissus environnants, de migrer à travers l'organisme et d'établir de nouvelles tumeurs dans des organes distants comme les poumons. La présence de métastases étant le signe d'une tumeur agressive, ces résultats sont en accord avec les données de la littérature indiquant que la surexpression de Pea3 dans les tumeurs du sein est un marqueur de l'agressivité tumorale (Bieche *et al.*, 2004;

Davidson *et al.*, 2004). De plus, l'agressivité des tumeurs est étroitement liée aux capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales, capacités augmentées dans les cellules TAC suite à la surexpression de Pea3 (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003).

Cependant, même s'il est établi que la surexpression de Pea3 dans des cellules tumorales mammaires leur confère des propriétés invasives et métastatiques (Kaya *et al.*, 1996) aucune donnée n'est disponible, à l'heure actuelle, pour affirmer qu'il puisse se comporter comme un oncogène, c'est à dire en induisant la transformation de cellules à caractère normal. En prenant ce critère en considération notre étude serait la première preuve d'un tel potentiel pour le facteur de transcription Pea3 dans des cellules épithéliales mammaires. Nous devons cependant rester prudent en interprétant ces résultats puisque la formation de tumeurs suite à l'injection des cellules témoin TAC pc-7 dans une des expériences que nous avons menée, même si ce phénomène reste minoritaire, nous amène à penser que les cellules témoins TAC pc-7 puissent, dans l'environnement de la glande mammaire, acquérir des propriétés de cellules transformées. Dans ce cas, nos résultats indiqueraient que la surexpression de Pea3 favoriserait ce phénomène, en augmentant donc la fréquence d'apparition des tumeurs. Dans le but de répondre à cette problématique nous allons devoir répéter l'expérience pour nous assurer que la formation de tumeurs suite à l'injection de cellules TAC pc-7 n'est pas la conséquence d'un problème technique, c'est à dire que les cellules TAC pc-7 ont bien la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans le contexte d'une glande mammaire. Enfin, pour confirmer ces résultats nous envisageons de tester le comportement des cellules TAC PLPCX Pea3-V5 après injection dans une glande mammaire murine, cela pour s'assurer que les résultats obtenus avec le clone cellulaire TAC Pea3-8 ne soit pas la conséquence d'un effet clonal.

Compte tenu des résultats obtenus précédemment indiquant que la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC augmentait leurs capacités de migration et d'invasion et leur conférait la capacité de faire de la morphogenèse de branchement dans le contexte d'une matrice de collagène, nous avons émis l'hypothèse que les cellules TAC Pea3-8 puissent envahir le mésenchyme de la glande mammaire dépourvu de son épithélium et former des tubes épithéliaux. Les résultats que nous apportons ne permettent pas de vérifier cette hypothèse. Il est possible que préalablement à la formation des tumeurs les cellules puissent s'organiser en tubes au sein du mésenchyme mammaire. Il nous faudra alors analyser les glandes mammaires plus précocement pour éprouver cette hypothèse.

Cependant, dans tous les cas, le contexte de la glande mammaire semble favoriser la transformation des cellules TAC Pea3-8. Le développement post natal du tissu mammaire étant sous la dépendance de diverses hormones et facteurs de croissance sécrétés par les cellules du stroma, il se peut que la surexpression de Pea3 dans ce contexte rende les cellules TAC plus sensibles à de tels signaux.

Le bilan de nos résultats semble indiquer que les cellules TAC Pea3-8 cultivées *in vitro* puissent servir de modèle pour l'étude du rôle de Pea3 dans le phénomène de morphogenèse mammaire alors que dans un contexte *in vivo* nos cellules TAC surexprimant Pea3 nous permettent d'étudier ses fonctions pro-tumorigènes. Ces deux événements sont étroitement liés et sont en accord avec le fait que Pea3 augmente les capacités de migration et d'invasion des cellules TAC (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003). Au vu de toutes ces données nous pensons que les cellules TAC Pea3-8, même si elles nous permettent d'étudier les mécanismes de morphogenèse mammaire *in vitro* ne nous autorisent pas pour l'instant à préciser le rôle de Pea3 dans le contexte d'une morphogenèse *in vivo*.

Un tel cas de figure a déjà été documenté dans la littérature. En effet, la surexpression de l'oncogène Ha-Ras dans les cellules épithéliales mammaires murines EpH4 leur confère des propriétés morphogénétiques accrues lorsqu'elles sont cultivées en gel de collagène où elle peuvent alors former des tubules épithéliaux et se différencier pour sécréter les protéines du lait. Cependant lorsque ces cellules sont injectées dans une glande mammaire de souris elles forment des tumeurs sous l'influence du TGF Bêta sécrété par les cellules du mésenchyme (Oft *et al.*, 1996). Il sera intéressant de déterminer quels sont les mécanismes qui permettent à Pea3 de former des tumeurs *in vivo* tout comme peut le faire la voie du TGF Bêta pour les cellules EpH4 surexprimant l'oncogène Ha-Ras. Nous verrons tout au long de cette discussion que nous avons pu, au cours de ma thèse, déterminer quelques pistes pour la définition de tels mécanismes, notamment lors de l'étude du gène *cycline d2*.

En parallèle des données collectées avec le modèle cellulaire TAC, l'aspect tumorigenèse mammaire avec la compréhension du rôle de Pea3 dans cet événement a été entrepris en utilisant des cellules épithéliales mammaires transformées, les cellules MMT. Dans ces cellules l'expression de Pea3 est réprimée par l'utilisation de petits ARN

interférents et au début de ma thèse j'ai participé aux expériences permettant de montrer que cette répression entraînait une diminution des capacités de prolifération, d'invasion et de migration par des tests *in vitro*. De plus, par des tests *in vivo* nous avons observé une diminution de la taille des tumeurs formées suite à l'injection des cellules dans le flanc de souris SCID (Firlej, Ladam *et al.*, 2008). Ces résultats indiquent donc que dans un contexte de cellules transformées Pea3 joue un rôle pro-tumorigène en modulant les propriétés de prolifération, de migration et d'invasion cellulaires. Notre approche de l'étude de Pea3 dans le contexte de la cancérisation mammaire est pour date la seule employant une technique de répression spécifique de l'expression de Pea3 permettant alors d'étudier la fonction précise de Pea3 par perte de fonction. En effet les études disponibles jusqu'à présent sont basées sur l'utilisation de modèles de surexpression de Pea3 (Kaya *et al.*, 1996) ou d'expression ectopique d'un dominant négatif de Pea3 dont la spécificité pour Pea3 au sein de la famille ETS reste à démontrer (Baker *et al.*, 2010; Shepherd *et al.*, 2001).

Ainsi, l'étude des modèles TAC et MMT apporte de nouveaux éléments de réflexion quant au rôle de Pea3 lors du développement des tumeurs mammaires. En effet, même si de nombreux travaux sont en accord avec nos données, indiquant un rôle pro-tumorigène du facteur de transcription Pea3 notamment au cours de la tumorigenèse induite par les oncogènes *erb2* ou *wnt-1* (Baker *et al.*, 2010; Shepherd *et al.*, 2001), il existe des données contradictoires au sein de la littérature. Ces données restent minoritaires mais pour exemple Xing et collaborateurs ont montré que la surexpression de Pea3 dans des lignées tumorales mammaires surexprimant l'oncogène Her2/Neu diminuait leur capacité à former des tumeurs *in vivo* et que cet effet pourrait être la conséquence de la répression de l'expression de l'oncogène *erb2* par Pea3 (Xing *et al.*, 2000). Dans cette étude les auteurs décrivent un effet délétère de la surexpression transitoire de Pea3 dans les cellules du sein exprimant l'oncogène Her2/Neu. Cet effet délétère n'étant pas sans rappeler l'effet de la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC il se peut que les effets qu'ils observent soit tout simplement la conséquence d'un niveau d'expression de Pea3 trop élevé dans ces cellules.

Nous savons que la surexpression de Pea3 dans des cellules épithéliales mammaires non transformées TAC leur confère des propriétés de migration et d'invasion accrues ainsi que la capacité de faire de la morphogenèse de branchement dans un contexte *in vitro* de

matrice extracellulaire de collagène. Dans cette étude nous avons montré que ces capacités pouvaient être associées à la capacité de former des tumeurs *in vivo* dans le contexte d'une glande mammaire. De façon complémentaire, la répression de Pea3 dans des cellules dont la transformation est établie, les cellules MMT, diminue les capacités tumorales de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. Ces deux stratégies nous indiquent que, dans certaines conditions, Pea3 joue un rôle pro-tumorigène. Cependant, le cancer du sein est une maladie complexe avec des tumeurs possédant des caractéristiques différentes au niveau phénotypique et moléculaire (Visvader, 2009). Il se peut donc que Pea3 puisse jouer des rôles différents en fonction du type de tumeurs dans lequel il est exprimé. Il semble en tout cas que nos modèles cellulaires soient adaptés à l'étude du rôle pro-tumorigène du facteur de transcription Pea3.

En nous basant sur les données phénotypiques obtenues dans les modèles cellulaires TAC et MMT suite à la modulation de l'expression de Pea3, nous avons analysé les mécanismes moléculaires qui sont régulés par Pea3 et qui pourraient permettre de comprendre comment il intervient dans la régulation des processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. Pea3 étant un facteur de transcription, son action passe par la modulation de l'expression des gènes. Dans le but de déterminer quels sont ces gènes, différentes analyses du transcriptome ont été entreprises dans nos modèles cellulaires d'études suite à la modulation de l'expression de Pea3.

III. Pea3 morphogenèse et tumorigenèse mammaires étude des mécanismes moléculaires régulés

Ainsi, trois analyses distinctes ont été réalisées à partir des cellules TAC surexprimant Pea3 ou MMT dans lesquelles l'expression de Pea3 est réprimée. La première, réalisée avant mon arrivée au laboratoire, permettant de visualiser l'expression d'un nombre restreint de gènes, a permis de mettre en évidence le gène *bax* ou encore le gène *cycline d2* dont l'étude est présentée dans ce manuscrit. Les deux autres, auxquelles j'ai pu participer ou qui ont été réalisées au cours de ma thèse, sont des analyses plus globales du transcriptome des cellules TAC dans lesquelles Pea3 est surexprimé et des cellules MMT dans lesquelles l'expression de Pea3 est réprimée. Brièvement, le transcriptome des cellules TAC ou MMT témoin est analysé et comparé respectivement à celui des cellules TAC ou MMT dans lesquelles l'expression de Pea3 est modulée. Nous

obtenons ainsi une liste de gènes dont l'expression varie entre les deux conditions comparées, liste à laquelle différents paramètres statistiques sont appliqués, notamment la définition d'une valeur de probabilité p. Dans nos analyses nous avons fixé la valeur p inférieure ou égale à 0,01 c'est à dire que les gènes que nous sélectionnons par l'analyse statistique ont une probabilité de 99% d'être régulés entre les conditions témoins et les conditions dans lesquelles l'expression de Pea3 est modulée. L'application de ces critères a permis de mettre en évidence 113 gènes ($p < 0,01$) dont l'expression est régulée suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules TAC et 85 gènes ($p < 0,01$) dont l'expression est modulée suite à la répression de l'expression de Pea3 dans le modèle MMT. Nous avons entrepris l'analyse de ces résultats de deux façons différentes et complémentaires. La première est une analyse manuelle des fonctions décrites dans la littérature d'un nombre restreint de ces gènes. Nous avons choisi, par analyse, de considérer les 20 gènes les plus fortement régulés se répartissant en 10 gènes dont l'expression est augmentée et 10 gènes dont l'expression est réprimée suite à la modulation de l'expression de Pea3 dans les modèles d'étude TAC ou MMT. La deuxième est une analyse globale par l'utilisation d'un outil bio-informatique, le logiciel Ingenuity Pathway Analysis®, à partir d'une liste de gènes plus conséquente.

1- Analyse manuelle des données d'analyses transcriptomiques

a. Pea3 régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus de migration, d'invasion et de prolifération cellulaires

Pea3 dans nos modèles cellulaires TAC et MMT semble, pour celles que nous avons pu évaluer au laboratoire, réguler des propriétés similaires comme les propriétés de prolifération de migration et d'invasion. En nous basant sur ces résultats, renforcés par les données de la littérature, nous pensons ainsi que Pea3 est un acteur des étapes de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires (Kurpios *et al.*, 2009; Shepherd and Hassell, 2001). Parmi les gènes pointés dans l'analyse et présentés dans les tableaux 3 et 4 de la partie Résultats beaucoup semblent pertinents pour expliquer les effets morphogénétiques engendrés par Pea3 dans nos deux modèles cellulaires TAC et MMT.

Nous avons remarqué que bon nombre d'entre eux étaient déjà décrits pour moduler les propriétés :

- de **migration et d'invasion**,
- de **prolifération et de différenciation**,
- de **contrôle du métabolisme cellulaire**.

Les gènes participant aux propriétés de **migration et d'invasion** cellulaires sont : les gènes *mmp13*, *serpine2*, *ap-o*, *cxcl5*, *tm4sf1* pour les cellules TAC et *fgfr1*, *eps8*, *snn*, *sesn2*, *fst*, *trp53inp1*, *hmmr* pour les cellules MMT. Pea3 étant associé au caractère invasif des cancers, comme le cancer du sein, ces gènes semblent pertinents pour agir en ce sens de concert avec Pea3 (de Launoit *et al.*, 2006; de Launoit *et al.*, 2000). L'analyse des données disponibles dans la littérature nous indique les informations suivantes.

Trois des gènes de cette liste semblent particulièrement intéressants à étudier. Ce sont les gènes *mmp13*, *serpine2* et *2010111101Rik (ap-o)*. Ils codent tous les trois des protéines régulant le processus de dégradation de la matrice extracellulaire (Diaz-Perales *et al.*, 2005; Fayard *et al.*, 2009; Nannuru *et al.*, 2010). La régulation de l'expression des métalloprotéases MMP par les membres du groupe PEA3 est un phénomène bien étudié. L'expression de nombreuses métalloprotéases de la famille des MMP est régulée au niveau transcriptionnel par des séquences localisées sur leur promoteur, séquences constituées d'un site EBS de fixation des facteurs de transcription de la famille ETS et d'un site de fixation du complexe de transcription AP1 composé des facteurs de transcription Fos et Jun (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Une coopération entre les sites EBS et AP1 pour la régulation de l'expression du gène *mmp13* a déjà été décrite. Les sites EBS et AP1 assurent la transactivation du promoteur du gène *mmp13*, notamment suite à la stimulation des chondrocytes par le TGF Bêta (Tardif *et al.*, 2001) ou la stimulation des cellules hépatiques stellaires par l'Interféron Alpha (Diaz-Sanjuan *et al.*, 2009). Les gènes *serpine2* et *ap-o* n'ont quant à eux jamais été décrits comme pouvant être régulés par Pea3 ou encore les facteurs Erm et Er81. Ils constituent alors potentiellement de nouveaux gènes cibles du groupe PEA3.

Fonctionnellement, aucun lien n'a pu être établi entre les *mmp13*, *serpine2*, *ap-o* et les facteurs de transcription du groupe PEA3. Cependant nous pouvons tout de même

remarquer quelques corrélations. En effet, la *Mmp13* et la *Serpine2* ont été décrites pour activer la *Mmp9* dans les cellules cancéreuses mammaires et participent ainsi à la régulation du processus métastatique (Fayard *et al.*, 2009; Nannuru *et al.*, 2010). *Pea3* pouvant augmenter l'expression de la *Mmp9*, comme nous l'avons montré dans le modèle TAC et comme indiqué dans les cellules cancéreuses mammaires (Qin *et al.*, 2008), il se peut alors qu'il y ait une relation entre ces trois gènes et que *Pea3* puisse jouer un rôle crucial lors de la cancérogenèse mammaire en régulant à la fois l'expression de la *Mmp9* mais aussi son activité à travers la régulation de l'expression des gènes *mmp13* et *serpine2*.

Dans le modèle MMT, *Pea3* régule l'expression de gènes impliqués dans la mise en place du cytosquelette. C'est le cas des gènes *myh7*, *tuba7* et *eps8*. Le gène *tuba7* code une Tubuline Alpha constituant des microtubules. Les microtubules sont impliqués dans le contrôle du fuseau de division mitotique mais aussi de la motilité des cellules (Etienne-Manneville, 2010). Le gène *eps8* code une protéine régulant l'élongation des extrémités des filaments d'actine, impliqués dans la formation des structures membranaires comme les filopodes (Disanza *et al.*, 2004; Funato *et al.*, 2004). Le gène *myh7* code une Myosine, les Myosines s'associent au cytosquelette d'actine pour réguler sa contraction favorisant ainsi la motilité des cellules (Parsons *et al.*, 2010). La régulation de la mise en place du cytosquelette est un élément important pour que les cellules puissent migrer et envahir les tissus. Ces trois gènes semblent donc d'un intérêt certain pour comprendre le rôle de *Pea3* pendant la tumorigenèse mammaire puisque la régulation de l'expression de ces trois gènes dans les cellules MMT suite à la répression de l'expression de *Pea3* est associée à une modulation des capacités de migration et d'invasion des cellules (Firlej, Ladam *et al.*, 2008). Ces données sont en accord avec l'étude de Chen et collaborateurs indiquant que dans les cellules MMT la surexpression de *Pea3* pouvait réguler l'activité du promoteur du gène *vimentine* dans les cellules cancéreuses mammaires, la Vimentine étant une composante des filaments intermédiaires régulant les processus d'invasion et de migration cellulaires (Chen *et al.*, 1996).

Différents gènes identifiés dans nos analyses sont aussi impliqués dans le contrôle de la **prolifération** et de la **différenciation** des cellules. C'est le cas des gènes *cdkn2b*, *ly6c* et *has2* dans les cellules TAC et des gènes *fgfr1*, *rras2*, *tra1* et *nusap1* dans les cellules MMT. Le gène *fgfr1* est particulièrement intéressant. Il code un récepteur

membranaire aux facteurs de croissance de la famille du FGF. L'activation de la voie de signalisation du FgFR1 dans les cellules épithéliales mammaires normales murines HC11 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et l'induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse (Xian *et al.*, 2007; Xian *et al.*, 2005). Pea3 étant un acteur clef de la voie du FGF pendant le développement de divers organes (cf Introduction) ce gène est particulièrement intéressant pour tenter de décrypter les mécanismes moléculaires permettant à Pea3 de réguler la prolifération des cellules épithéliales mammaires cancéreuses. Nous pouvons ainsi faire le lien avec le gène *cdkn2b* qui est régulé par Pea3 dans les cellules TAC. Ce gène code une protéine qui inhibe la progression du cycle cellulaire en interagissant avec les complexes protéiques Cycline D/CDK. La répression de l'expression de ce gène fait le lien entre régulation du cycle cellulaire et induction d'une transition épithélio-mésenchymateuse dans les cellules épithéliales mammaires (Sandhu *et al.*, 1997). Ces gènes seront donc pertinents à étudier pour l'étude de la fonction de Pea3 pendant les étapes de morphogenèse et de tumorigenèse notamment pour le contrôle des propriétés de prolifération et lors du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Différents gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales mammaires ont déjà été documentés dans d'autres modèles cellulaires. Il s'agit des gènes *cycline d3* et *p21Cip1* (Funaoka *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2007a). Nous n'avons pas été en mesure d'identifier ces gènes lors de nos analyses transcriptomiques mais il se peut alors que la régulation de ces gènes soit dépendante du type cellulaire étudié.

b. Autres gènes intéressants pour l'étude du facteur de transcription Pea3

Ce sont les gènes *cidec*, *hpxn*, *ugt2b36*, *dio3* et *slc5a1* dans le modèle cellulaire TAC. Le gène *ugt2b36* est particulièrement intéressant car il prend part à la dégradation des hormones stéroïdiennes comme les estrogènes qui sont indispensables à la mise en place de la glande mammaire et qui sont souvent impliqués dans la cancérisation de cette dernière (cf Introduction). La découverte de ces gènes indique alors potentiellement de nouvelles fonctions pour le facteur de transcription Pea3 qui pourrait intervenir dans le contrôle du métabolisme cellulaire.

2- Analyse bio-informatique, une vision globale pour la définition de nouvelles hypothèses de recherche

L'étude manuelle de la fonction des gènes dont l'expression est modulée dans les cellules TAC et MMT suite à la modulation de l'expression de Pea3 nous apporte de nouvelles pistes de recherche pour comprendre comment Pea3 régule les processus de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. En parallèle de cette étude et dans le but d'améliorer les informations disponibles grâce aux analyses transcriptomiques, nous avons envisagé l'utilisation d'un outil bio-informatique qui nous permet de considérer l'ensemble des données issues de ces analyses. Pour ce faire nous avons utilisé le logiciel d'analyse Ingenuity Pathway Analysis®. Ce logiciel organise les gènes obtenus dans les analyses transcriptomiques à grande échelle sous forme réseaux de molécules. Les réseaux sont formés en associant des gènes décrits dans la littérature pour interagir physiquement ou fonctionnellement. Nous avons émis l'hypothèse que Pea3 puisse réguler des ensembles de gènes capables d'interagir pour moduler ensemble les propriétés morphogénétiques des cellules TAC et MMT. L'utilisation du logiciel nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de réseaux et nous en avons pointé trois qui nous ont paru pertinents connaissant le rôle de Pea3 dans nos modèles cellulaires et dans la littérature.

Ainsi, nous avons mis en évidence un réseau moléculaire faisant intervenir les protéines Fos, Mmp13 et Serpine2 dans les cellules TAC suite à la surexpression de Pea3. Comme nous l'avons précédemment noté, l'étude des gènes *mmp13* et *serpine2* est d'un intérêt majeur pour la compréhension du rôle de Pea3. Le logiciel nous oriente aussi vers le gène *fos* dont l'expression semble augmentée dans les cellules TAC Pea3-8. Pea3 et les protéines du complexe AP1 (Fos et Jun) interagissent pour réguler l'expression de différents gènes impliqués lors du processus de tumorigenèse mammaire (El-Tanani *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2006; Subbaramaiah *et al.*, 2002). Il est alors possible que la protéine Fos soit un atout majeur pour que Pea3 puisse réguler les propriétés morphogénétiques des cellules TAC.

L'analyse par le logiciel nous oriente aussi vers la voie de signalisation du TGF Bêta. En effet elle permet de mettre en évidence que, suite à la surexpression de Pea3 dans les cellules, un certain nombre d'acteurs de cette voie voient leur expression transcriptionnelle modulée. C'est le cas des gènes *tgfbr1*, *smurf2*, *smad4* et *cdkn2b*. La

voie TGF Bêta est impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la migration des cellules épithéliales et notamment les cellules épithéliales mammaires (pour revue, (Bierie and Moses, 2006). Le TGF Bêta est aussi un inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse notamment dans le modèle de cellules épithéliales mammaires NMuMG dont sont issues les cellules TAC, notre modèle d'étude (Lindley and Briegel, 2010; Soriano *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 2009). La stimulation des cellules NMuMG par le TGF Bêta induit une répression de l'expression transcriptionnelle du gène *e-cadherine* via le recrutement des protéines **Smad4** et Ets1 sur son promoteur (Shirakihara *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2009). Les cellules TAC, quant à elles, répondent à une stimulation par le TGF Bêta de façon dose dépendante. En effet, Soriano et collaborateurs ont montré que de faibles concentrations de TGF Bêta induisaient la formation de structures branchées lorsque les cellules sont placées dans un gel tridimensionnel de collagène, tout comme peut le faire la surexpression de Pea3 dans ces cellules (Chotteau-Lelievre *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 1996). Il se pourrait alors que Pea3 induise ces effets morphogénétiques en régulant l'activité de la voie TGF Bêta dans les cellules TAC. Quelques preuves d'une telle hypothèse sont déjà disponibles dans la littérature puisque Pea3 est capable de moduler l'activité du promoteur du gène *tgfbr2* codant un récepteur au TGF Bêta dans des cellules de carcinome embryonnaire. Nous reviendrons sur l'analyse du gène *cdkn2b* et la pertinence de la voie TGF Bêta lors de la discussion des données relatives aux travaux que nous avons mené sur le gène *cycline d2*.

Ce lien entre Pea3 et la voie de signalisation du TGF Bêta peut aussi être rapporté au modèle MMT suite à la modulation de l'expression de Pea3. En effet, même si le logiciel Ingenuity Pathway ne nous renseigne pas sur une telle relation, l'analyse manuelle des gènes que nous avons réalisée précédemment nous indique la présence des gènes *fst* et *sesn2* qui interagissent avec cette voie de signalisation pour moduler son activité. Le gène *fst* est particulièrement intéressant car il code la Follistatine, une protéine antagoniste des protéines Activine et BMPs qui sont des ligands extracellulaires de la famille du TGF Bêta (Massague and Chen, 2000).

Enfin, dans le modèle MMT, notre attention s'est portée sur un réseau moléculaire regroupant des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Parmi ceux là l'analyse par le logiciel nous indique que Pea3 régule l'expression des gènes *e2f4*, *hdac1* et *nfkb2*. Les trois protéines issues de ces gènes agissent directement au niveau des

promoteurs des gènes pour réguler leur transcription comme le fait Pea3 (Chen *et al.*, 2009; Rayet and Gelinas, 1999; Wade, 2001). Le facteur de transcription E2f4 régule l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire pour le passage de la phase G1 vers la phase S (Conboy *et al.*, 2007). De plus, E2f4 est capable d'interagir avec la protéine Hdac1 pour réprimer l'expression de certains gènes cibles (Rayman *et al.*, 2002). Il se pourrait alors que Pea3, en régulant l'expression de ces gènes, puisse moduler l'activité des complexes Hdac1-E2f4 et donc l'expression de gènes spécifiques de la régulation du cycle cellulaire. Pour le moment aucune corrélation n'a pas pu être renseignée dans littérature concernant une relation entre Pea3 et les gènes *hdac1*, *E2f4* ou *nfkb2*. Ainsi ces gènes pourraient constituer de nouveaux gènes cibles de Pea3 pour réguler la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.

Nous sommes conscient que l'analyse bio-informatique n'est qu'informatrice et qu'elle n'a de valeur que si les hypothèses qu'elle permet d'établir peuvent être éprouvées expérimentalement. Cependant, elle nous permet d'orienter notre recherche pour l'étude des mécanismes moléculaires régulés par Pea3 et que nous n'aurions pas été en mesure de décrypter par une analyse manuelle des gènes régulés par Pea3 dans les modèles cellules TAC et MMT.

L'ensemble des données récoltées par l'analyse manuelle et l'analyse bio-informatique permettent d'établir de nouvelles hypothèses en nous orientant vers de nouveaux gènes régulés par Pea3. Ces hypothèses devraient nous permettre de mieux comprendre le rôle de Pea3 lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires. La suite de cette étude consistera alors à éprouver ces hypothèses. L'étude du gène *cycline d2* fait exemple de stratégie et de méthodes utilisées pour caractériser les gènes cibles de Pea3 ainsi que leur niveau d'implication dans les effets induits par Pea3 dans nos modèles cellulaires de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires, les cellules TAC et MMT.

IV. Le gène cycline d2, un nouveau gène cible de Pea3

Précédemment à mon arrivée au laboratoire, le gène *cycline d2* avait été décrit comme étant régulé suite à la surexpression du facteur Erm dans les cellules TAC. Cette observation a depuis été complétée dans les cellules MMT suite à la répression de Erm

(Firlej, Ladam *et al.*, 2008) suggérant que le gène *cycline d2* puisse être un nouveau gène cible de Erm et plus généralement des membres du groupe PEA3, dans les cellules TAC et MMT. Au début de ma thèse, nous avons testé cette hypothèse en nous focalisant sur le facteur de transcription Pea3 pour lequel nous possédons le plus d'outils. Ainsi, l'étude de la régulation de l'expression du gène *cycline d2* par le facteur de transcription Pea3 a été initiée. Nous avons alors pu montrer que le gène *cycline D2* est un gène cible direct de Pea3 dans les cellules TAC puisque Pea3 induit une augmentation de l'expression au niveau transcriptionnel comme protéique des deux isoformes *cycline d2* et *cycline d2 trc* codées par ce gène, cela en se fixant directement au niveau de la région promotrice et en régulant ainsi le processus de transcription.

Afin d'affiner les mécanismes impliquant Pea3 pour la régulation de l'expression du gène *cycline d2*, l'analyse de son promoteur a été entreprise. Cette analyse a permis de localiser la région de chromatine située entre -343 et -288pb par rapport au codon d'initiation de la traduction comme étant la région de chromatine permettant le recrutement de Pea3 et la régulation de l'activité du promoteur dans notre modèle d'étude TAC. Au sein de cette région nous avons aussi identifié trois séquences consensus de fixation des facteurs de transcription de la famille ETS 5' GGAA/T 3'. La comparaison de ces séquences entre la souris, le rat et l'homme montre qu'elles sont très conservées entre ces trois espèces, ce qui est en faveur de leur importance potentielle pour l'activité du promoteur. Nous avons donc entrepris de les étudier en y introduisant des mutations ponctuelles. Ainsi la mutation de ces séquences montrent qu'elles sont importantes pour l'activité du promoteur et sa transactivation par Pea3. Cependant nous ne pouvons pas affirmer qu'elles permettent le recrutement de Pea3 au niveau de la séquence promotrice. Afin de répondre à cette question nous pourrions tester l'affinité de Pea3 pour cette région de chromatine par une technique de retard sur gel, en utilisant des oligonucléotides contenant ou non des mutations des sites EBS identifiés. Diverses régions du promoteur sont documentées dans la littérature pour contrôler l'expression du gène *cycline d2* dans différents contextes. Parmi les mécanismes impliqués, la régulation de l'activité de ce promoteur par le facteur de transcription Myc est la mieux décrite. Myc en complexe avec les cofacteurs interagit avec les promoteurs humain et murin au niveau d'une région située 865 paires de bases en amont du codon d'initiation de la traduction (Bouchard *et al.*, 1999). Dans notre modèle cellulaire d'étude, les cellules TAC, cette région promotrice ne semble pas importante pour son activité ni pour sa transactivation par le facteur Pea3. La région de

promoteur que nous avons mise en évidence a été décrite pour recruter les facteurs de transcription TCF4 et CREB en collaboration avec la protéine β -caténine précisant ainsi le lien entre la régulation du gène *cycline d2* et la voie Wnt/ β -Caténine déjà documenté dans d'autres études (Cole *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2007). Le facteur de transcription Pea3 a déjà été décrit pour interagir avec la voie de signalisation Wnt/ β -Caténine, notamment pour la régulation de l'expression des gènes *ostéopontine* et *matrilysine*, deux gènes impliqués dans l'agressivité des cellules cancéreuses (Crawford *et al.*, 2001; El-Tanani *et al.*, 2004). Pea3 pourrait alors interagir avec cette voie de signalisation pour réguler la transcription du gène *cycline d2* dans les cellules TAC. Nous avons testé cette hypothèse par des tests d'activité rapportrice luciférase sans pour l'instant pouvoir montrer de relation entre la régulation par Pea3 et la voie Wnt/ β -Caténine.

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris l'analyse de l'expression des transcrits *pea3*, *cycline d2* et *cycline d2 trc* lors des différents stades de développement de la glande mammaire. Nous avons ainsi pu observer que les trois transcrits sont exprimés aux mêmes stades de développement à savoir majoritairement pendant la puberté et la gestation. Ce résultat constitue la première description de l'expression de l'ARN messager *cycline d2 trc* lors des étapes de développement de la glande mammaire. Les résultats concernant l'expression de l'ARN messager *cycline d2* sont en accord avec les données de Kong et collaborateurs indiquant une expression de l'isoforme Cycline D2 exclusivement pendant les étapes de puberté et de gestation (Kong *et al.*, 2002). En désaccord avec cette étude, nous avons montré que l'ARN messager *cycline d2* est aussi exprimé spécifiquement pendant l'étape d'involution de la glande mammaire, contrairement aux transcrits *pea3* et *cycline d2 trc*. Cette différence pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité des différentes techniques employées dans notre étude et celle de Kong. En effet Kong et collaborateur ont analysé l'expression de la protéine Cycline D2 et n'ont pas observé de marquage spécifique lors de l'étape d'involution. Notre technique de PCR est probablement plus sensible en permettant de détecter des niveaux d'ARN messagers même en très faible quantité.

Ces résultats sont pourtant à analyser avec prudence puisque par cette technique nous ne pouvons pas affirmer que les transcrits analysés sont présents dans les mêmes cellules au sein de la glande mammaire en formation. Cependant, au vu des données obtenues dans les cellules TAC, nous émettons l'hypothèse que le même mécanisme de

régulation de l'expression du gène *cycline d2* par Pea3 puisse avoir lieu lors des étapes de formation de la glande mammaire. Concernant l'expression spécifique de l'ARN messager *cycline d2* observée pendant le stade d'involution, elle doit être la conséquence de mécanismes de régulation de l'expression du gène *cycline d2* indépendant du facteur de transcription Pea3.

Ce travail nous a permis de comprendre la relation de régulation d'expression entre Pea3 et le gène *cycline d2* dans les cellules épithéliales mammaires TAC. L'étape suivante de notre étude a donc été de savoir si les deux protéines codées par le gène *cycline d2* et régulées par Pea3, les Cycline D2 et Cycline D2 Trc, pouvaient être impliquées dans les effets induits par Pea3 dans ces cellules.

V. Quelles fonctions pour les isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc dans les effets induits par Pea3 ?

Compte tenu du fait que Pea3 confère la capacité aux cellules TAC de faire de la morphogenèse lorsque ces cellules sont placées dans une matrice de collagène, nous avons analysé l'effet d'une modulation de l'expression de l'une ou l'autre des deux isoformes Cycline D2 sur cette propriété morphogénétique. Pour cela nous avons envisagé deux approches complémentaires.

La première est basée sur la surexpression des Cycline D2 ou Cycline D2 Trc dans les cellules TAC. De cette façon nous avons pu montrer un effet opposé de ces deux isoformes puisque la Cycline D2 Trc confère la capacité aux cellules de faire de la morphogenèse de façon spontanée comme le fait Pea3, alors que la Cycline D2 n'induit pas un tel effet et semble même inhiber la morphogenèse induite par le facteur de croissance HGF que nous utilisons comme témoin positif d'induction de morphogenèse pour les cellules TAC. Ce résultat nous renseigne sur un rôle potentiellement opposé des deux isoformes Cycline D2 et Cycline D2 Trc pour le contrôle des propriétés morphogénétiques des cellules TAC. La Cycline D2 Trc jouant un rôle similaire à Pea3 et la Cycline D2 jouant un rôle opposé à Pea3 dans le contexte de la morphogenèse mammaire. L'effet de la surexpression de la Cycline D2 peut paraître surprenant puisque Pea3 induit à la fois des capacités de morphogénèse spontanée dans les cellules et l'augmentation de l'expression de cette isoforme. Il se peut alors que la régulation de l'expression de la Cycline D2 Trc par Pea3 dans les cellules TAC permette à Pea3

d'induire des propriétés morphogénétiques alors que la surexpression de la Cycline D2 contrôle les effets de Pea3 sur les propriétés morphogénétiques des cellules TAC selon un mécanisme de régulation négative. Nous avancerons quelques hypothèses quant au rôle de la Cycline D2 dans ce contexte au cours de la discussion.

La deuxième approche a consisté à inhiber l'expression de l'une ou l'autre des isoformes dans un contexte de surexpression de Pea3 dans les cellules TAC (TAC Pea3-8). En faisant cela nous espérons apprécier la fonction des cycline D2 et Cycline D2 Trc lors de la morphogenèse induite par le facteur de transcription Pea3. Malheureusement il semble que la transfection des siRNA dans les cellules TAC Pea3-8 est délétère lorsque les cellules sont placées dans la matrice de collagène, empêchant ainsi toute interprétation. Pour essayer de palier à ce problème, afin de pouvoir répondre à cette question importante, nous faisons actuellement varier les conditions expérimentales par exemple en changeant l'agent de transfection par une molécule moins toxique. Nous envisageons aussi l'utilisation d'un vecteur rétroviral qui nous permettrait d'obtenir des cellules exprimant de façon stable et constitutive des séquences shRNA, ce qui affranchirait de l'utilisation d'un agent de transfection.

En parallèle des tests de morphogénèse en matrice de collagène, connaissant le rôle des Cycline D dans le contrôle de la prolifération des cellules, nous avons analysé l'effet de la surexpression de Pea3 sur le potentiel prolifératif des cellules TAC. Ainsi les cellules surexprimant Pea3 (TAC Pea3-8 et TAC PLPCX Pea3-V5) prolifèrent moins rapidement que les cellules témoins (TAC pc-7 ou TAC PLPCX). Les Cycline D2 et Cycline D2 Trc ont été décrites pour moduler le potentiel répliatif de différents types cellulaires. Par exemple, la surexpression de la Cycline D2 dans les cardiomyocytes augmente leurs propriétés de prolifération alors que l'expression de l'isoforme Cycline D2 Trc bloque cet effet (Sun *et al.*, 2009). De plus, dans les cellules NIH3T3, l'expression de la Cycline D2 est augmentée lorsque les cellules sont privées en sérum ou lorsqu'elles stoppent leur croissance par inhibition de contact et la surexpression de la Cycline D2 dans ces cellules entraîne un blocage en phase S du cycle cellulaire (Meyyappan *et al.*, 1998). Afin de déterminer si les Cycline D2 et Cycline D2 Trc peuvent intervenir dans la répression de la prolifération des cellules TAC observée suite à la surexpression de Pea3, nous avons utilisé des séquences siRNA spécifiques de l'une ou l'autre des deux isoformes. Ainsi, l'inhibition de l'isoforme Cycline D2 entraîne une diminution de la capacité proliférative

des cellules TAC Pea3-8 indiquant son rôle dans ce phénomène. Pour savoir si cet effet était dépendant de la surexpression de Pea3, nous avons réalisé la même expérience dans les cellules TAC pc-7 et montré le même effet que dans les cellules TAC Pea3-8. Ceci indique donc que l'augmentation de l'expression de la Cycline D2 par Pea3 ne permet pas d'expliquer la diminution de prolifération observée pour les cellules TAC Pea3-8 *versus* les cellules témoins TAC pc-7. Concernant l'isoforme tronquée, même si nous n'avons pas observé de variation des capacités de prolifération des cellules TAC Pea3-8 ou TAC pc-7, nous ne pouvons pas affirmer qu'elle n'intervienne pas dans ce phénomène puisque nous sommes à l'heure actuelle incapable de valider la répression au niveau protéique de la Cycline D2 Trc suite à la transfection des siRNA correspondants, faute d'anticorps fonctionnel entre nos mains.

A la recherche de la fonction des Cycline D2 et Cycline D2Trc, nous avons observé que l'utilisation d'un siRNA ciblant la Cycline D2 changeait la morphologie des cellules et que ce changement était plus spécifique des modèles TAC surexprimant Pea3. En effet, l'inhibition de la Cycline D2 dans les cellules TAC Pea3-8 ou TAC PLPCX Pea3-V5 donne aux cellules une forme plus étirée rappelant celle de cellules fibroblastiques, effet déjà initié lors de la surexpression de Pea3 dans ces mêmes cellules. Au contraire, l'inhibition de la Cycline D2 Trc ne semble pas modifier l'effet de la surexpression de Pea3 sur la morphologie des cellules TAC. Pour essayer de comprendre ce phénomène et le caractériser au niveau moléculaire, nous nous sommes appuyés sur quelques données de la littérature indiquant que le passage d'un aspect épithélial vers un aspect fibroblastique est acquis lors du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Cette transition est caractérisée par la perte de l'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-Cadherine et l'expression de marqueurs de cellules du mésenchyme comme les facteurs de transcription Twist1, Snail1 ou encore Vimentine (Lindley et al., 2010). Elle est aussi caractérisée par des modulations de la progression du cycle cellulaire notamment suite à l'induction de l'expression du gène *cdkn2b* dans les cellules épithéliales mammaires (Sandhu et al., 2010). Nous avons alors émis l'hypothèse que la répression des Cycline D2 puisse moduler cet événement.

Pour tester notre hypothèse nous avons entrepris d'analyser l'expression d'un certain nombre de ces marqueurs moléculaires. Une première analyse dans les cellules TAC pc-7 *versus* TAC pea3-8 indique que la surexpression de Pea3 n'induit pas

d'expression des gènes *twist1*, *hgf* et *cripto1* mais permet l'augmentation du gène *mmp13* et une diminution de l'expression du gène *cdkn2b*. Lorsque nous inhibons la Cycline D2 Trc dans les cellules TAC Pea3-8 nous n'observons pas de modulation de l'expression de ces gènes sauf pour le gène *mmp13*, ce qui peut être corrélé au fait que la répression de la Cycline D2 Trc dans les cellules TAC surexprimant Pea3 ne présentent pas de modification de leur morphologie. Au contraire, l'inhibition de la Cycline D2 permet l'expression des gènes *hgf* et *cripto1* et une augmentation de celle du gène *cdkn2b*. Même si cela demande à être complété, la modulation de l'expression de ces trois marqueurs nous indique que Pea3 ne serait pas suffisant pour induire une TEM et que l'inhibition de la Cycline D2 permettrait cette transition. Afin de déterminer si l'effet de la Cycline D2 est dépendant de la présence de Pea3 nous réalisons la même expérience dans des cellules TAC pc-7. Nous complétons aussi l'étude des mécanismes moléculaires associés à la TEM suite à l'inhibition de l'expression de la Cycline D2 en analysant l'expression des protéines Vimentine et E-Cadhérine. En effet, pendant le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse on observe une perte progressive de l'expression de la E-Cadherine ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine Vimentine. La modulation de l'expression de ces deux protéines rend alors les cellules plus mobiles, ce qui est une caractéristique des cellules ayant subi une TEM. Ainsi, nous testons actuellement les capacités migratoires des cellules TAC suite à la surexpression de Pea3 et suite à la répression ou non de l'expression de la Cycline D2.

Pea3 augmente donc l'expression de la Cycline D2 dans les cellules TAC et la répression de l'expression de la Cycline D2 pourrait induire une TEM. Nous pouvons alors penser que la surexpression de la Cycline D2 serve de frein pour contrôler précisément le temps d'induction de la TEM lors du phénomène de morphogenèse par exemple. En effet, il a été montré que la TEM est un phénomène très coordonné, subi par un petit groupe de cellules qui décident d'envahir le stroma pour former de nouveaux tubes épithéliaux (Leroy and Mostov, 2007). De plus il s'agit d'un phénomène transitoire et réversible très bien contrôlé (Thiery, 2002). Il doit alors pouvoir exister des mécanismes de régulation négative de l'expression ou de la fonction de la Cycline D2 permettant une TEM à un moment bien précis et permettant alors le processus de morphogenèse mammaire. En considérant cette hypothèse nous pouvons alors mieux comprendre pourquoi les cellules TAC surexprimant de façon stable et constitutive la Cycline D2 n'ont pas la capacité de faire de la morphogenèse lorsqu'elles sont placées dans une matrice de collagène. En effet,

l'expression forcée de la Cycline D2 dans ces cellules doit pouvoir empêcher les cellules de subir une TEM lorsqu'elles en ont le besoin pour former les tubes épithéliaux.

Une corrélation inverse entre l'expression de la Cycline D2 et le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse a déjà pu être documentée dans la littérature. En effet la Cycline D2 possède un profil d'expression parfaitement opposé à celui de la protéine Snail lors du développement du système nerveux. Dans cette étude les auteurs décrivent aussi que Snail induit une TEM dans les cellules MDCK et qu'il réprime l'activité du promoteur du gène *cycline d2* (Vega *et al.*, 2004). De plus, une autre étude indique que l'induction d'une TEM par la stimulation des cellules NMuMG avec du TGF Bêta diminue l'expression de l'ARN messager *cycline d2* (Xie *et al.*, 2003). Ainsi la répression de l'expression de la Cycline D2, que nous simulons à l'aide de nos siRNA dans les cellules TAC et TAC surexprimant Pea3, et qui nous oriente vers un phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse, semble pouvoir être observée lors de l'induction d'un tel phénomène dans divers modèles de cellules épithéliales.

La TEM est importante pour la formation des organes comme la glande mammaire mais elle est aussi importante pour la cancérogenèse et notamment l'acquisition de propriétés invasives et métastatiques (Thiery, 2002). Par conséquent, si la répression de la Cycline D2 est associée à la TEM, alors son expression doit pouvoir être réprimée dans les tumeurs et en ce qui nous concerne dans les tumeurs du sein. En accord avec cette idée, la répression de l'expression de la Cycline D2 au niveau transcriptionnel dans les tumeurs et lignées cancéreuses mammaires est un phénomène décrit (Evron *et al.*, 2001) que nous avons pu confirmer ici dans notre étude en contrôlant l'expression de l'ARN messager *cycline d2* dans des échantillons de tumeurs mammaires humaines. De plus, l'analyse de l'expression de l'ARN messager *cycline d2* dans les tumeurs issues de l'injection des cellules TAC Pea3-8 dans la glande mammaire de souris immunodéprimées indique une perte systématique de l'expression de l'ARN messager. Cette perte d'expression est observée sans qu'il y ait néanmoins modulation de l'expression de l'ARN messager Pea3. Pourtant, *in vitro*, les cellules TAC Pea3-8 surexpriment la Cycline D2 par une action directe de Pea3 sur le promoteur de ce gène. Cela montre qu'*in vivo* lorsque les cellules possèdent la possibilité de former des tumeurs, elles perdent en même temps l'expression de la Cycline D2. Ce dernier résultat est en accord avec un rôle suppresseur de la TEM pour la Cycline D2 et donc potentiellement un rôle d'inhibition de la tumorigenèse, rôle

qui serait alors indépendant de celui de Pea3 lors d'un état tumoral avéré. Afin d'éprouver cette hypothèse, nous testerons l'effet de la surexpression de la Cycline D2 sur le potentiel tumorigène des cellules MMT auquel participe le facteur de transcription Pea3 et dans lesquelles nous ne détectons pas de Cycline D2 au niveau protéique (données non montrées).

Alors, si notre hypothèse se valide, la surexpression seule de Pea3 dans les cellules TAC ne serait pas suffisante pour induire la formation de tumeurs mais nécessiterait la répression de l'expression de la Cycline D2 pour induire un phénomène de TEM, même si ce dernier reste à caractériser plus finement.

Nos données concernent essentiellement l'étude de l'isoforme Cycline D2 et nous ne sommes pas en mesure à l'heure actuelle de préciser le rôle de l'isoforme Cycline D2 Trc lors des événements induits par le facteur de transcription Pea3 dans les cellules TAC. Comme nous l'avons déjà discuté, sa surexpression dans les cellules TAC leur confère la capacité de faire de la morphogenèse de façon spontanée dans une matrice de collagène, tout comme le fait le Pea3. Cette protéine semble donc intéressante pour comprendre comment Pea3 intervient dans le processus de morphogenèse mammaire. De plus, l'analyse de son expression au niveau transcriptionnel dans les échantillons de tumeurs humaines indique une régulation opposée à celle observée pour l'ARN messager *cycline d2* puisque dans la majorité des tumeurs que nous avons analysées on observe une surexpression du transcrit *cycline d2 trc* par rapport à celle observée dans les cellules témoins HMEC. Ce résultat semble alors indiquer un rôle pro-tumorigène dans ce contexte, rejoignant alors celui décrit pour Pea3 (Baker *et al.*, 2010; Bieche *et al.*, 2004; Shepherd *et al.*, 2001). Cependant l'analyse de son expression dans les tumeurs issues de l'injection des cellules TAC Pea3-8 montre que son expression est réprimée tout comme l'est celle de l'ARN messager *cycline d2*, sachant que nous sommes ici dans un autre contexte tumoral, à savoir des tumeurs induites par l'injection de cellules 'transformées'. Ce résultat indique toute la complexité de l'étude de cette isoforme codée par le gène *cycline d2*. L'étude de la protéine Cycline D2 Trc devra être complétée pour savoir si elle est impliquée ou non dans les phénotypes induits par le facteur de transcription Pea3. En effet pour l'instant nous ne possédons pas les outils nécessaires à une étude complète du rôle de cette protéine. Nous devons valider un anticorps fonctionnel permettant d'analyser son expression au niveau protéique et valider de cette façon l'augmentation de son expression suite à la

surexpression de Pea3 dans les cellules TAC mais aussi suite à l'inhibition de l'expression de la Cycline D2 Trc.

VI. Pea3 études phénotypiques, transcriptomiques et relation avec le gène *cycline d2*, vision globale des résultats

Le travail réalisé sur le gène *cycline d2* rejoint les données obtenues avec les analyses transcriptomiques à grande échelle indiquant la présence de nombreux gènes impliqués dans la TEM et notamment pour le contrôle de la voie TGF Bêta. En effet, nous avons déjà montré que la répression de la Cycline D2 dans les cellules TAC Pea3-8 entraînait une augmentation de l'expression des gènes *cdkn2b* et *mmp13*, deux gènes cibles de la voie du TGF Bêta (Sandhu *et al.*, 1997; Tardif *et al.*, 2001). Nous pourrions nous baser sur les données des analyses transcriptomiques afin d'apprécier l'effet de Pea3 en combinaison avec la Cycline D2 sur l'activité de cette voie du TGF Bêta et le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. Ainsi, les analyses transcriptomiques couplées à l'étude du gène *cycline d2* ouvrent de nouvelles voies de recherche pour la compréhension du rôle du facteur de transcription Pea3 lors des événements de morphogenèse et de tumorigenèse mammaires.

L'idée que Pea3 puisse réguler la TEM de façon concertée avec le gène *cycline d2* est aussi en accord avec les données phénotypiques observées dans les cellules TAC et MMT mais aussi les données disponibles dans la littérature. En effet, de nombreuses études indiquent que ce facteur de transcription est important pour l'établissement d'un phénomène migratoire et métastatique (Hakuma *et al.*, 2005; Hiroumi *et al.*, 2001; Kaya *et al.*, 1996). Cet effet d'induction du potentiel métastatique a été montré par Kaya et collaborateurs dans les cellules mammaires cancéreuses MCF-7, cellules qui n'expriment pas de Cycline D2 (Evron *et al.*, 2001; Kaya *et al.*, 1996). Il est donc tout à fait possible que Pea3 puisse induire une TEM dans les tumeurs ce qui les rendrait métastatiques et que cet effet nécessite la répression de l'expression de la Cycline D2. Concernant le développement de la glande mammaire, l'expression de Pea3 est observée dans les cellules non différenciées progénitrices des cellules luminales épithéliales où il contrôlerait leur différenciation (Kurpios *et al.*, 2009). Or, il a été décrit que ces cellules subissant une TEM adoptent des caractéristiques de cellules non différenciées de type cellules souches (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008). Ainsi, Pea3 pourrait réguler le comportement de ces

cellules progénitrices en modulant l'expression du gène *cycline d2* et/ou l'activité de la voie du TGF Bêta en modulant l'expression des gènes décrits dans l'analyse transcriptomique.

VII. Conclusion et perspectives

Précédemment à mon travail de thèse, l'implication de Pea3 dans les événements de migration et d'invasion cellulaires avait pu être montrée dans les cellules épithéliales mammaires TAC. Au cours de ma thèse, nous avons pu confirmer cet effet dans un modèle cellulaire de tumorigenèse mammaire, les cellules MMT, et montré dans les TAC et MMT que Pea3 participe à l'acquisition de propriétés tumorigéniques *in vivo*. Afin d'expliquer ces phénomènes, nous avons analysé les mécanismes moléculaires régulés par Pea3 dans nos modèles cellulaires grâce à des analyses transcriptomiques à grande échelle et l'analyse d'un nouveau gène cible de Pea3, le gène *cycline d2*. De cette façon, nous avons effectivement pu montrer que Pea3 régule l'expression de nombreux gènes décrits pour réguler les événements de migration, d'invasion et de prolifération cellulaires, ce qui permet d'amorcer la description des mécanismes moléculaires régulés par Pea3 lui permettant d'induire ces effets dans les cellules épithéliales mammaires normales et cancéreuses. De plus, les études transcriptomiques, tout comme l'étude du gène *cycline d2*, nous ont permis de faire le lien entre Pea3 et le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse. La suite de notre travail consiste actuellement à explorer plus précisément la relation entre Pea3, Cycline D2 et transition épithélio-mésenchymateuse. Pour cela nous testerons les hypothèses apportées par les analyses transcriptomiques, notamment l'étude des réseaux moléculaires qui a permis de remarquer que la surexpression de Pea3 permet la modulation de l'expression de divers gènes participant à la régulation de l'activité de la voie de signalisation du TGF Bêta. L'ensemble de ces travaux devra permettre de mieux comprendre comment Pea3 est impliqué dans les événements de la morphogénèse et de la tumorigenèse mammaires. De plus, cela permettra de définir de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle de ces événements, gènes dont l'interaction avec le facteur Pea3 sera étudiée plus finement par la suite.

Au terme de ce travail exploratoire, nous essayerons de définir, parmi les molécules caractérisées comme cibles de Pea3 et actrices de la tumorigenèse, celles qui pourraient être utilisables en thérapeutique.

- Aaltonen K, Amini RM, Landberg G, Eerola H, Aittomaki K, Heikkila P *et al* (2009). Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **113**: 75-82.
- Ansieau S, Morel AP, Hinkal G, Bastid J, Puisieux A TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* **29**: 3173-84.
- Arber S, Ladle DR, Lin JH, Frank E, Jessell TM (2000). ETS gene Er81 controls the formation of functional connections between group Ia sensory afferents and motor neurons. *Cell* **101**: 485-98.
- Arvand A, Denny CT (2001). Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* **20**: 5747-54.
- Asselin-Labat ML, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC *et al* (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* **9**: 201-9.
- Baert JL, Beaudoin C, Coutte L, de Launoit Y (2002). ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem* **277**: 1002-12.
- Baert JL, Beaudoin C, Monte D, Degerny C, Mauen S, de Launoit Y (2007). The 26S proteasome system degrades the ERM transcription factor and regulates its transcription-enhancing activity. *Oncogene* **26**: 415-24.
- Baker R, Kent CV, Silbermann RA, Hassell JA, Young LJ, Howe LR (2010). Pea3 transcription factors and wnt1-induced mouse mammary neoplasia. *PLoS One* **5**: e8854.
- Barembaum M, Bronner-Fraser M Pax2 and Pea3 synergize to activate a novel regulatory enhancer for spalt4 in the developing ear. *Dev Biol* **340**: 222-31.
- Baxter FO, Neoh K, Tevendale MC (2007). The beginning of the end: death signaling in early involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **12**: 3-13.
- Benz CC, O'Hagan RC, Richter B, Scott GK, Chang CH, Xiong X *et al* (1997). HER2/Neu and the Ets transcription activator PEA3 are coordinately upregulated in human breast cancer. *Oncogene* **15**: 1513-25.
- Bieche I, Tozlu S, Girault I, Onody P, Driouch K, Vidaud M *et al* (2004). Expression of PEA3/E1AF/ETV4, an Ets-related transcription factor, in breast tumors: positive links to MMP2, NRG1 and CGB expression. *Carcinogenesis* **25**: 405-11.
- Bierie B, Moses HL (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 506-20.
- Bojovic BB, Hassell JA (2001). The PEA3 Ets transcription factor comprises multiple domains that regulate transactivation and DNA binding. *J Biol Chem* **276**: 4509-21.

- Bojovic BB, Hassell JA (2008). The transactivation function of the Pea3 subfamily Ets transcription factors is regulated by sumoylation. *DNA Cell Biol* **27**: 289-305.
- Bosc DG, Goueli BS, Janknecht R (2001). HER2/Neu-mediated activation of the ETS transcription factor ER81 and its target gene MMP-1. *Oncogene* **20**: 6215-24.
- Bouchard C, Thieke K, Maier A, Saffrich R, Hanley-Hyde J, Ansorge W *et al* (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**: 5321-33.
- Boussadia O, Kutsch S, Hierholzer A, Delmas V, Kemler R (2002). E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland. *Mech Dev* **115**: 53-62.
- Brent AE, Tabin CJ (2004). FGF acts directly on the somitic tendon progenitors through the Ets transcription factors Pea3 and Erm to regulate scleraxis expression. *Development* **131**: 3885-96.
- Brisken C, Rajaram RD (2006). Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **11**: 239-48.
- Brown LA, Amores A, Schilling TF, Jowett T, Baert JL, de Launoit Y *et al* (1998). Molecular characterization of the zebrafish PEA3 ETS-domain transcription factor. *Oncogene* **17**: 93-104.
- Brown TA, McKnight SL (1992). Specificities of protein-protein and protein-DNA interaction of GABP alpha and two newly defined ets-related proteins. *Genes Dev* **6**: 2502-12.
- Brysbaert G, Noth S, Benecke A (2007). Generation of synthetic transcriptome data with defined statistical properties for the development and testing of new analysis methods. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **5**: 45-52.
- Chauvet S, Dessaud E, de Lapeyrière O (2004). Spécification des neurones moteurs spinaux des vertébrés supérieurs: une conversation à deux. *M/S : médecine sciences* **20**: 135-158.
- Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H *et al* (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature* **436**: 1030-4.
- Chen HZ, Tsai SY, Leone G (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* **9**: 785-97.
- Chen JH, Vercamer C, Li Z, Paulin D, Vandebunder B, Stehelin D (1996). PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene* **13**: 1667-75.
- Chotteau-Lelievre A, Desbiens X, Pelczar H, Defosse PA, de Launoit Y (1997). Differential expression patterns of the PEA3 group transcription factors through murine embryonic development. *Oncogene* **15**: 937-52.

- Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Peronne V, Coutte L, de Launoit Y, Desbiens X (2001). Expression patterns of the Ets transcription factors from the PEA3 group during early stages of mouse development. *Mech Dev* **108**: 191-5.
- Chotteau-Lelievre A, Montesano R, Soriano J, Soulie P, Desbiens X, de Launoit Y (2003). PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Dev Biol* **259**: 241-57.
- Chotteau-Lelievre A, Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Desbiens X, Cabaret V *et al* (2004). Prognostic value of ERM gene expression in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* **10**: 7297-303.
- Cole AM, Myant K, Reed KR, Ridgway RA, Athineos D, Van den Brink GR *et al* (2010). Cyclin D2-Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Is Required for Efficient Proliferation and Tumorigenesis following Apc Loss. *Cancer Res*.
- Conboy CM, Spyrou C, Thorne NP, Wade EJ, Barbosa-Morais NL, Wilson MD *et al* (2007). Cell cycle genes are the evolutionarily conserved targets of the E2F4 transcription factor. *PLoS One* **2**: e1061.
- Conzen SD (2008). Minireview: nuclear receptors and breast cancer. *Mol Endocrinol* **22**: 2215-28.
- Coutte L, Monte D, Imai K, Pouilly L, Dewitte F, Vidaud M *et al* (1999). Characterization of the human and mouse ETV1/ER81 transcription factor genes: role of the two alternatively spliced isoforms in the human. *Oncogene* **18**: 6278-86.
- Cowden Dahl KD, Dahl R, Kruichak JN, Hudson LG (2009). The epidermal growth factor receptor responsive miR-125a represses mesenchymal morphology in ovarian cancer cells. *Neoplasia* **11**: 1208-15.
- Cowden Dahl KD, Zeineldin R, Hudson LG (2007). PEA3 is necessary for optimal epidermal growth factor receptor-stimulated matrix metalloproteinase expression and invasion of ovarian tumor cells. *Mol Cancer Res* **5**: 413-21.
- Crawford HC, Fingleton B, Gustavson MD, Kurpios N, Wagenaar RA, Hassell JA *et al* (2001). The PEA3 subfamily of Ets transcription factors synergizes with beta-catenin-LEF-1 to activate matrilysin transcription in intestinal tumors. *Mol Cell Biol* **21**: 1370-83.
- Daniel CW, Robinson S, Silberstein GB (1996). The role of TGF-beta in patterning and growth of the mammary ductal tree. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **1**: 331-41.
- Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Reich R (2003). PEA3 is the second Ets family transcription factor involved in tumor progression in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 1412-9.

- Davidson B, Goldberg I, Tell L, Vigdorichik S, Baekelandt M, Berner A *et al* (2004). The clinical role of the PEA3 transcription factor in ovarian and breast carcinoma in effusions. *Clin Exp Metastasis* **21**: 191-9.
- de Launoit Y, Audette M, Pelczar H, Plaza S, Baert JL (1998). The transcription of the intercellular adhesion molecule-1 is regulated by Ets transcription factors. *Oncogene* **16**: 2065-73.
- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau-Lelievre A, Monte D, Coutte L, Mauen S *et al* (2006). The Ets transcription factors of the PEA3 group: transcriptional regulators in metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1766**: 79-87.
- de Launoit Y, Baert JL, Chotteau A, Monte D, Defosse PA, Coutte L *et al* (1997). Structure-function relationships of the PEA3 group of Ets-related transcription factors. *Biochem Mol Med* **61**: 127-35.
- de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A, Beaudoin C, Coutte L, Netzer S, Brenner C *et al* (2000). The PEA3 group of ETS-related transcription factors. Role in breast cancer metastasis. *Adv Exp Med Biol* **480**: 107-16.
- Degerny C, de Launoit Y, Baert JL (2008). ERM transcription factor contains an inhibitory domain which functions in sumoylation-dependent manner. *Biochim Biophys Acta* **1779**: 183-94.
- Degerny C, Monte D, Beaudoin C, Jaffray E, Portois L, Hay RT *et al* (2005). SUMO modification of the Ets-related transcription factor ERM inhibits its transcriptional activity. *J Biol Chem* **280**: 24330-8.
- Denicourt C, Kozak CA, Rassart E (2003). Grisl, a new common integration site in Graffi murine leukemia virus-induced leukemias: overexpression of a truncated cyclin D2 due to alternative splicing. *J Virol* **77**: 37-44.
- Denicourt C, Legault P, McNabb FA, Rassart E (2008). Human and mouse cyclin D2 splice variants: transforming activity and subcellular localization. *Oncogene* **27**: 1253-62.
- di Bari MG, Ginsburg E, Plant J, Strizzi L, Salomon DS, Vonderhaar BK (2009). Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1. *J Cell Physiol* **219**: 659-66.
- Diaz-Perales A, Quesada V, Sanchez LM, Ugalde AP, Suarez MF, Fueyo A *et al* (2005). Identification of human aminopeptidase O, a novel metalloprotease with structural similarity to aminopeptidase B and leukotriene A4 hydrolase. *J Biol Chem* **280**: 14310-7.
- Diaz-Sanjuan T, Garcia-Ruiz I, Rodriguez-Juan C, Munoz-Yague T, Solis-Munoz P, Solis-Herruzo JA (2009). Interferon alpha increases metalloproteinase-13 gene expression through a polyomavirus enhancer activator 3-dependent pathway in hepatic stellate cells. *J Hepatol* **50**: 128-39.

- Disanza A, Carlier MF, Stradal TE, Didry D, Frittoli E, Confalonieri S *et al* (2004). Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nat Cell Biol* **6**: 1180-8.
- Dowdy SC, Mariani A, Janknecht R (2003). HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81. *J Biol Chem* **278**: 44377-84.
- Eckel KL, Tentler JJ, Cappetta GJ, Diamond SE, Gutierrez-Hartmann A (2003). The epithelial-specific ETS transcription factor ESX/ESE-1/Elf-3 modulates breast cancer-associated gene expression. *DNA Cell Biol* **22**: 79-94.
- El-Tanani M, Platt-Higgins A, Rudland PS, Campbell FC (2004). Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-Jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem* **279**: 20794-806.
- Eo J, Han K, K MM, Song H, Lim HJ (2008). Etv5, an ETS transcription factor, is expressed in granulosa and cumulus cells and serves as a transcriptional regulator of the cyclooxygenase-2. *J Endocrinol* **198**: 281-90.
- Etienne-Manneville S (2010). From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 104-11.
- Evron E, Umbricht CB, Korz D, Raman V, Loeb DM, Niranjana B *et al* (2001). Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res* **61**: 2782-7.
- Ewan KB, Henshall-Powell RL, Ravani SA, Pajares MJ, Arteaga C, Warters R *et al* (2002). Transforming growth factor-beta1 mediates cellular response to DNA damage in situ. *Cancer Res* **62**: 5627-31.
- Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, Lopez-Otin C (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 3-19.
- Fayard B, Bianchi F, Dey J, Moreno E, Djaffer S, Hynes NE *et al* (2009). The serine protease inhibitor nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. *Cancer Res* **69**: 5690-8.
- Firlej V, Bocquet B, Desbiens X, de Launoit Y, Chotteau-Lelievre A (2005). Pea3 transcription factor cooperates with USF-1 in regulation of the murine bax transcription without binding to an Ets-binding site. *J Biol Chem* **280**: 887-98.
- Firlej V, Ladam F, Brysbaert G, Dumont P, Fuks F, de Launoit Y *et al* (2008). Reduced tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *J Cell Sci* **121**: 3393-402.
- Fleming FJ, Myers E, Kelly G, Crotty TB, McDermott EW, O'Higgins NJ *et al* (2004). Expression of SRC-1, AIB1, and PEA3 in HER2 mediated endocrine resistant breast cancer; a predictive role for SRC-1. *J Clin Pathol* **57**: 1069-74.

- Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG (2004). Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* **145**: 5439-47.
- Funaoka K, Shindoh M, Yoshida K, Hanzawa M, Hida K, Nishikata S *et al* (1997). Activation of the p21(Waf1/Cip1) promoter by the ets oncogene family transcription factor E1AF. *Biochem Biophys Res Commun* **236**: 79-82.
- Funato Y, Terabayashi T, Suenaga N, Seiki M, Takenawa T, Miki H (2004). IRSp53/Eps8 complex is important for positive regulation of Rac and cancer cell motility/invasiveness. *Cancer Res* **64**: 5237-44.
- Fuxe J, Vincent T, de Herreros AG (2010). Transcriptional crosstalk between TGFbeta and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* **9**.
- Galang CK, Muller WJ, Foos G, Oshima RG, Hauser CA (2004). Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *J Biol Chem* **279**: 11281-92.
- Glickstein SB, Alexander S, Ross ME (2007). Differences in cyclin D2 and D1 protein expression distinguish forebrain progenitor subsets. *Cereb Cortex* **17**: 632-42.
- Gocke CB, Yu H, Kang J (2005). Systematic identification and analysis of mammalian small ubiquitin-like modifier substrates. *J Biol Chem* **280**: 5004-12.
- Goel A, Janknecht R (2003). Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol* **23**: 6243-54.
- Goel A, Janknecht R (2004). Concerted activation of ETS protein ER81 by p160 coactivators, the acetyltransferase p300 and the receptor tyrosine kinase HER2/Neu. *J Biol Chem* **279**: 14909-16.
- Goueli BS, Janknecht R (2004). Upregulation of the Catalytic Telomerase Subunit by the Transcription Factor ER81 and Oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* **24**: 25-35.
- Greenall A, Willingham N, Cheung E, Boam DS, Sharrocks AD (2001). DNA binding by the ETS-domain transcription factor PEA3 is regulated by intramolecular and intermolecular protein-protein interactions. *J Biol Chem* **276**: 16207-15.
- Grimm S, Brdiczka D (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* **12**: 841-55.
- Guo B, Sharrocks AD (2009). Extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase signaling initiates a dynamic interplay between sumoylation and ubiquitination to regulate the activity of the transcriptional activator PEA3. *Mol Cell Biol* **29**: 3204-18.

- Gutman A, Wasylyk B (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *Embo J* **9**: 2241-6.
- Haase G, Dessaud E, Garces A, de Bovis B, Birling M, Filippi P *et al* (2002). GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**: 893-905.
- Hagedorn L, Paratore C, Brugnoli G, Baert JL, Mercader N, Suter U *et al* (2000). The Ets domain transcription factor Erm distinguishes rat satellite glia from Schwann cells and is regulated in satellite cells by neuregulin signaling. *Dev Biol* **219**: 44-58.
- Hakuma N, Kinoshita I, Shimizu Y, Yamazaki K, Yoshida K, Nishimura M *et al* (2005). E1AF/PEA3 activates the Rho/Rho-associated kinase pathway to increase the malignancy potential of non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Res* **65**: 10776-82.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K *et al* (2000). Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis* **21**: 1079-85.
- Hart AH, Reventar R, Bernstein A (2000). Genetic analysis of ETS genes in *C. elegans*. *Oncogene* **19**: 6400-8.
- Hasegawa H, Ashigaki S, Takamatsu M, Suzuki-Migishima R, Ohbayashi N, Itoh N *et al* (2004). Laminar patterning in the developing neocortex by temporally coordinated fibroblast growth factor signaling. *J Neurosci* **24**: 8711-9.
- Hata H, Kitamura T, Higashino F, Hida K, Yoshida K, Ohiro Y *et al* (2008). Expression of E1AF, an ets-oncogene transcription factor, highly correlates with malignant phenotype of malignant melanoma through up-regulation of the membrane-type-1 matrix metalloproteinase gene. *Oncol Rep* **19**: 1093-8.
- Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, Laxman B, Cao Q, Prensner JR *et al* (2008). Characterization of TMPRSS2:ETV5 and SLC45A3:ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 73-80.
- Hellman NE, Spector J, Robinson J, Zuo X, Saunier S, Antignac C *et al* (2008). Matrix metalloproteinase 13 (MMP13) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 (TIMP1), regulated by the MAPK pathway, are both necessary for Madin-Darby canine kidney tubulogenesis. *J Biol Chem* **283**: 4272-82.
- Helmbacher F, Dessaud E, Arber S, deLapeyriere O, Henderson CE, Klein R *et al* (2003). Met signaling is required for recruitment of motor neurons to PEA3-positive motor pools. *Neuron* **39**: 767-77.

- Higashino F, Yoshida K, Fujinaga Y, Kamio K, Fujinaga K (1993). Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res* **21**: 547-53.
- Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K (1995). Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* **10**: 1461-3.
- Hinck L, Silberstein GB (2005). Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res* **7**: 245-51.
- Hippenmeyer S, Huber RM, Ladle DR, Murphy K, Arber S (2007). ETS transcription factor Erm controls subsynaptic gene expression in skeletal muscles. *Neuron* **55**: 726-40.
- Hippenmeyer S, Shneider NA, Birchmeier C, Burden SJ, Jessell TM, Arber S (2002). A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron* **36**: 1035-49.
- Hippenmeyer S, Vrieseling E, Sigrist M, Portmann T, Laengle C, Ladle DR *et al* (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS Biol* **3**: e159.
- Hiroumi H, Dosaka-Akita H, Yoshida K, Shindoh M, Ohbuchi T, Fujinaga K *et al* (2001). Expression of E1AF/PEA3, an Ets-related transcription factor in human non-small-cell lung cancers: its relevance in cell motility and invasion. *Int J Cancer* **93**: 786-91.
- Horiuchi S, Yamamoto H, Min Y, Adachi Y, Itoh F, Imai K (2003). Association of ets-related transcriptional factor E1AF expression with tumour progression and overexpression of MMP-1 and matrilysin in human colorectal cancer. *J Pathol* **200**: 568-76.
- Howe LR, Crawford HC, Subbaramaiah K, Hassell JA, Dannenberg AJ, Brown AM (2001). PEA3 is up-regulated in response to Wnt1 and activates the expression of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **276**: 20108-15.
- Howe LR, Watanabe O, Leonard J, Brown AM (2003). Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation. *Cancer Res* **63**: 1906-13.
- Hsu T, Schulz RA (2000). Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene* **19**: 6409-16.
- Huang W, Chang HY, Fei T, Wu H, Chen YG (2007). GSK3 beta mediates suppression of cyclin D2 expression by tumor suppressor PTEN. *Oncogene* **26**: 2471-82.
- Ishida S, Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Suzuki T, Shindoh M *et al* (2006). Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 325-30.
- Izzi L, Attisano L (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 2071-8.

- Janknecht R (1996). Analysis of the ERK-stimulated ETS transcription factor ER81. *Mol Cell Biol* **16**: 1550-6.
- Janknecht R (2005). EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* **363**: 1-14.
- Janknecht R, Monte D, Baert JL, de Launoit Y (1996). The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving MAPK and PKA. *Oncogene* **13**: 1745-54.
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS, Sublett JE, Roussel MF, Denny CT *et al* (1995). A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* **10**: 1229-34.
- Jiang J, Wei Y, Liu D, Zhou J, Shen J, Chen X *et al* (2007a). E1AF promotes breast cancer cell cycle progression via upregulation of Cyclin D3 transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 53-8.
- Jiang J, Wei Y, Shen J, Liu D, Chen X, Zhou J *et al* (2007b). Functional interaction of E1AF and Sp1 in glioma invasion. *Mol Cell Biol* **27**: 8770-82.
- Jun DY, Kim MK, Kim IG, Kim YH (1997). Characterization of the murine cyclin D2 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Mol Cells* **7**: 537-43.
- Kaneko Y, Yoshida K, Handa M, Toyoda Y, Nishihira H, Tanaka Y *et al* (1996). Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* **15**: 115-21.
- Karim FD, Urness LD, Thummel CS, Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A *et al* (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev* **4**: 1451-3.
- Kaya M, Yoshida K, Higashino F, Mitaka T, Ishii S, Fujinaga K (1996). A single ets-related transcription factor, E1AF, confers invasive phenotype on human cancer cells. *Oncogene* **12**: 221-7.
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT *et al* (2007). The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* **1**: 84-96.
- Kilker RL, Planas-Silva MD (2006). Cyclin D1 is necessary for tamoxifen-induced cell cycle progression in human breast cancer cells. *Cancer Res* **66**: 11478-84.
- Kim CA, Phillips ML, Kim W, Gingery M, Tran HH, Robinson MA *et al* (2001). Polymerization of the SAM domain of TEL in leukemogenesis and transcriptional repression. *Embo J* **20**: 4173-82.

- Kim ES, Sohn YW, Moon A (2007). TGF-beta-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF)2 in human breast epithelial cells. *Cancer Lett* **252**: 147-56.
- Kinoshita J, Kitamura K, Tanaka S, Sugimachi K, Ishida M, Saeki H (2002). Clinical significance of PEA3 in human breast cancer. *Surgery* **131**: S222-5.
- Kong G, Chua SS, Yijun Y, Kittrell F, Moraes RC, Medina D *et al* (2002). Functional analysis of cyclin D2 and p27(Kip1) in cyclin D2 transgenic mouse mammary gland during development. *Oncogene* **21**: 7214-25.
- Koo SJ, Pfaff SL (2002). Fine-tuning motor neuron properties: signaling from the periphery. *Neuron* **35**: 823-6.
- Kopp JL, Wilder PJ, Desler M, Kim JH, Hou J, Nowling T *et al* (2004). Unique and selective effects of five Ets family members, Elf3, Ets1, Ets2, PEA3, and PU.1, on the promoter of the type II transforming growth factor-beta receptor gene. *J Biol Chem* **279**: 19407-20.
- Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* **127**: 1041-55.
- Kucera J, Cooney W, Que A, Szeder V, Stancz-Szeder H, Walro J (2002). Formation of supernumerary muscle spindles at the expense of Golgi tendon organs in ER81-deficient mice. *Dev Dyn* **223**: 389-401.
- Kulesa PM, Bailey CM, Kasemeier-Kulesa JC, McLennan R (2010). Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Dev Biol* **344**: 543-54.
- Kurpios NA, MacNeil L, Shepherd TG, Gludish DW, Giacomelli AO, Hassell JA (2009). The Pea3 Ets transcription factor regulates differentiation of multipotent progenitor cells during mammary gland development. *Dev Biol* **325**: 106-21.
- Kuure S, Chi X, Lu B, Costantini F (2010). The transcription factors Etv4 and Etv5 mediate formation of the ureteric bud tip domain during kidney development. *Development* **137**: 1975-9.
- Ladle DR, Frank E (2002). The role of the ETS gene PEA3 in the development of motor and sensory neurons. *Physiol Behav* **77**: 571-6.
- Laget MP, Defosse PA, Albagli O, Baert JL, Dewitte F, Stehelin D *et al* (1996). Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene* **12**: 1325-36.
- Laing MA, Coonrod S, Hinton BT, Downie JW, Tozer R, Rudnicki MA *et al* (2000). Male sexual dysfunction in mice bearing targeted mutant alleles of the PEA3 ets gene. *Mol Cell Biol* **20**: 9337-45.
- Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, Hinds PW (2006). Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer Cell* **9**: 13-22.

- Lanigan F, O'Connor D, Martin F, Gallagher WM (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**: 3159-84.
- Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Dutertre-Coquillaud M (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* **18**: 1351-9.
- Lee Y, Hami D, De Val S, Kagermeier-Schenk B, Wills AA, Black BL *et al* (2009). Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Dev Biol* **331**: 270-80.
- Leprince D, Gégonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C *et al* (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**: 395-7.
- Leroy P, Mostov KE (2007). Slug is required for cell survival during partial epithelial-mesenchymal transition of HGF-induced tubulogenesis. *Mol Biol Cell* **18**: 1943-52.
- Lin JH, Saito T, Anderson DJ, Lance-Jones C, Jessell TM, Arber S (1998). Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* **95**: 393-407.
- Lindley LE, Briegel KJ (2010). Molecular characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 659-64.
- Liu Y, Borchert GL, Phang JM (2004). Polyoma enhancer activator 3, an ets transcription factor, mediates the induction of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in colorectal cancer cells. *J Biol Chem* **279**: 18694-700.
- Liu Y, Jiang H, Crawford HC, Hogan BL (2003). Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development. *Dev Biol* **261**: 10-24.
- Livet J, Sigrist M, Stroebel S, De Paola V, Price SR, Henderson CE *et al* (2002). ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron* **35**: 877-92.
- Lu BC, Cebrian C, Chi X, Kuure S, Kuo R, Bates CM *et al* (2009). Etv4 and Etv5 are required downstream of GDNF and Ret for kidney branching morphogenesis. *Nat Genet* **41**: 1295-302.
- Lu WC, Liu YN, Kang BB, Chen JH (2003). Trans-activation of heparanase promoter by ETS transcription factors. *Oncogene* **22**: 919-23.
- Luetkeke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A *et al* (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* **126**: 2739-50.

- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY *et al* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704-15.
- Mao J, McGlenn E, Huang P, Tabin CJ, McMahon AP (2009). Fgf-dependent Etv4/5 activity is required for posterior restriction of Sonic Hedgehog and promoting outgrowth of the vertebrate limb. *Dev Cell* **16**: 600-6.
- Massague J, Chen YG (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**: 627-44.
- Matsui K, Sugimori K, Motomura H, Ejiri N, Tsukada K, Kitajima I (2006). PEA3 cooperates with c-Jun in regulation of HER2/neu transcription. *Oncol Rep* **16**: 153-8.
- McCabe KL, McGuire C, Reh TA (2006). Pea3 expression is regulated by FGF signaling in developing retina. *Dev Dyn* **235**: 327-35.
- McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell S (2007). Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci* **64**: 3201-18.
- Mejlvang J, Kriajevska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G *et al* (2007). Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **18**: 4615-24.
- Meyyappan M, Wong H, Hull C, Riabowol KT (1998). Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. *Mol Cell Biol* **18**: 3163-72.
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **15**: 117-34.
- Michos O, Cebrian C, Hyink D, Grieshammer U, Williams L, D'Agati V *et al* Kidney development in the absence of Gdnf and Spry1 requires Fgf10. *PLoS Genet* **6**: e1000809.
- Molina G, Vogt A, Bakan A, Dai W, Queiroz de Oliveira P, Znosko W *et al* (2009). Zebrafish chemical screening reveals an inhibitor of Dusp6 that expands cardiac cell lineages. *Nat Chem Biol* **5**: 680-7.
- Monge M, Colas E, Doll A, Gonzalez M, Gil-Moreno A, Planaguma J *et al* (2007). ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Res* **67**: 6753-9.
- Monte D, Baert JL, Defosse PA, de Launoit Y, Stehelin D (1994). Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors. *Oncogene* **9**: 1397-406.
- Monte D, Coutte L, Baert JL, Angeli I, Stehelin D, de Launoit Y (1995). Molecular characterization of the ets-related human transcription factor ER81. *Oncogene* **11**: 771-9.

- Monte D, Coutte L, Dewitte F, Defosse PA, Le Coniat M, Stehelin D *et al* (1996). Genomic organization of the human ERM (ETV5) gene, a PEA3 group member of ETS transcription factors. *Genomics* **35**: 236-40.
- Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* **3**: e2888.
- Morrow CM, Hostetler CE, Griswold MD, Hofmann MC, Murphy KM, Cooke PS *et al* (2007). ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood testes barrier function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci* **1120**: 144-51.
- Morrow CM, Tyagi G, Simon L, Carnes K, Murphy KM, Cooke PS *et al* (2009). Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Biol Reprod* **81**: 871-9.
- Myers E, Hill AD, Kelly G, McDermott EW, O'Higgins NJ, Young LS (2006). A positive role for PEA3 in HER2-mediated breast tumour progression. *Br J Cancer* **95**: 1404-9.
- Naga Prasad SV, Duan ZH, Gupta MK, Surampudi VS, Volinia S, Calin GA *et al* (2009). Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *J Biol Chem* **284**: 27487-99.
- Nakae K, Nakajima K, Inazawa J, Kitaoka T, Hirano T (1995). ERM, a PEA3 subfamily of Ets transcription factors, can cooperate with c-Jun. *J Biol Chem* **270**: 23795-800.
- Nannuru KC, Futakuchi M, Varney ML, Vincent TM, Marcusson EG, Singh RK (2010). Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. *Cancer Res* **70**: 3494-504.
- Nemade RV, Bierie B, Nozawa M, Bry C, Smith GH, Vasioukhin V *et al* (2004). Biogenesis and function of mouse mammary epithelium depends on the presence of functional alpha-catenin. *Mech Dev* **121**: 91-9.
- Netzer S, Leenders F, Dumont P, Baert JL, de Launoit Y (2002). Ectopic expression of the ets transcription factor ER81 in transgenic mouse mammary gland enhances both urokinase plasminogen activator and stromelysin-1 transcription. *Transgenic Res* **11**: 123-31.
- Nishida T, Terashima M, Fukami K, Yamada Y (2007). Repression of E1AF transcriptional activity by sumoylation and PIASy. *Biochem Biophys Res Commun* **360**: 226-32.

- Nosho K, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Hinoda Y, Imai K (2005a). Gene expression profiling of colorectal adenomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br J Cancer* **92**: 1193-200.
- Nosho K, Yoshida M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Mikami M *et al* (2005b). Association of Ets-related transcriptional factor E1AF expression with overexpression of matrix metalloproteinases, COX-2 and iNOS in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**: 892-9.
- Noth S, Benecke A (2005). Avoiding inconsistencies over time and tracking difficulties in Applied Biosystems AB1700/Panther probe-to-gene annotations. *BMC Bioinformatics* **6**: 307.
- Noth S, Brysbaert G, Benecke A (2006). Normalization using weighted negative second order exponential error functions (NeONORM) provides robustness against asymmetries in comparative transcriptome profiles and avoids false calls. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **4**: 90-109.
- Nye JA, Petersen JM, Gunther CV, Jonsen MD, Graves BJ (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* **6**: 975-90.
- O'Hagan RC, Tozer RG, Symons M, McCormick F, Hassell JA (1996). The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* **13**: 1323-33.
- Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem* **282**: 25842-51.
- Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E (1996). TGF-beta1 and Ha-Ras collaborate in modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumor cells. *Genes Dev* **10**: 2462-77.
- Oikawa T, Yamada T (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **303**: 11-34.
- Papoutsopoulou S, Janknecht R (2000). Phosphorylation of ETS transcription factor ER81 in a complex with its coactivators CREB-binding protein and p300. *Mol Cell Biol* **20**: 7300-10.
- Paratore C, Brugnoli G, Lee HY, Suter U, Sommer L (2002). The role of the Ets domain transcription factor Erm in modulating differentiation of neural crest stem cells. *Dev Biol* **250**: 168-80.
- Parkinson DB, Langner K, Namini SS, Jessen KR, Mirsky R (2002). beta-Neuregulin and autocrine mediated survival of Schwann cells requires activity of Ets family transcription factors. *Mol Cell Neurosci* **20**: 154-67.

- Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010). Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 633-43.
- Patel TD, Kramer I, Kucera J, Niederkofler V, Jessell TM, Arber S *et al* (2003). Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron* **38**: 403-16.
- Pei XH, Bai F, Smith MD, Usary J, Fan C, Pai SY *et al* (2009). CDK inhibitor p18(INK4c) is a downstream target of GATA3 and restrains mammary luminal progenitor cell proliferation and tumorigenesis. *Cancer Cell* **15**: 389-401.
- Peinado H, Olmeda D, Cano A (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* **7**: 415-28.
- Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H *et al* (2008). The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol* **28**: 5937-50.
- Qin L, Liu Z, Chen H, Xu J (2009). The steroid receptor coactivator-1 regulates twist expression and promotes breast cancer metastasis. *Cancer Res* **69**: 3819-27.
- Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF *et al* (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* **7**: 1559-71.
- Raible F, Brand M (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by *Fgf* signaling during early zebrafish development. *Mech Dev* **107**: 105-17.
- Rayet B, Gelinas C (1999). Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. *Oncogene* **18**: 6938-47.
- Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ *et al* (2002). E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* **16**: 933-47.
- Rodriguez D, Morrison CJ, Overall CM Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 39-54.
- Roehl H, Nusslein-Volhard C (2001). Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol* **11**: 503-7.
- Roussigne M, Blader P (2006). Divergence in regulation of the PEA3 family of ETS transcription factors. *Gene Expr Patterns*.
- Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan CH, Yaswen P *et al* (1997). Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* **17**: 2458-67.

- Sedy J, Tseng S, Walro JM, Grim M, Kucera J (2006). ETS transcription factor ER81 is required for the Pacinian corpuscle development. *Dev Dyn* **235**: 1081-9.
- Shepherd T, Hassell JA (2001). Role of Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **6**: 129-40.
- Shepherd TG, Kockeritz L, Szrajber MR, Muller WJ, Hassell JA (2001). The pea3 subfamily ets genes are required for HER2/Neu-mediated mammary oncogenesis. *Curr Biol* **11**: 1739-48.
- Shindoh M, Higashino F, Kaya M, Yasuda M, Funaoka K, Hanzawa M *et al* (1996). Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol* **148**: 693-700.
- Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K (2007). Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta. *Mol Biol Cell* **18**: 3533-44.
- Siegel PM, Muller WJ (2010). Transcription factor regulatory networks in mammary epithelial development and tumorigenesis. *Oncogene* **29**: 2753-9.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**: 177-82.
- Soriano JV, Orci L, Montesano R (1996). TGF-beta1 induces morphogenesis of branching cords by cloned mammary epithelial cells at subpicomolar concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 879-85.
- Soriano JV, Pepper MS, Nakamura T, Orci L, Montesano R (1995). Hepatocyte growth factor stimulates extensive development of branching duct-like structures by cloned mammary gland epithelial cells. *J Cell Sci* **108**: 413-30.
- Srinivasan K, Strickland P, Valdes A, Shin GC, Hinck L (2003). Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis. *Dev Cell* **4**: 371-82.
- Sternlicht MD (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* **8**: 201.
- Sternlicht MD, Sunnarborg SW (2008). The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **13**: 181-94.
- Strickland P, Shin GC, Plump A, Tessier-Lavigne M, Hinck L (2006). Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development* **133**: 823-32.

- Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ (2002). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* **277**: 18649-57.
- Sun Q, Zhang F, Wafa K, Baptist T, Pasumarthi KB (2009). A splice variant of cyclin D2 regulates cardiomyocyte cell cycle through a novel protein aggregation pathway. *J Cell Sci* **122**: 1563-73.
- Takahashi A, Higashino F, Aoyagi M, Yoshida K, Itoh M, Kobayashi M *et al* (2005). E1AF degradation by a ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **327**: 575-80.
- Tardif G, Reboul P, Dupuis M, Geng C, Duval N, Pelletier JP *et al* (2001). Transforming growth factor-beta induced collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes is triggered by Smad proteins: cooperation between activator protein-1 and PEA-3 binding sites. *J Rheumatol* **28**: 1631-9.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 442-54.
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Smith LR, Roulston D, Helgeson BE *et al* (2006). TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* **66**: 3396-400.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW *et al* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* **310**: 644-8.
- Trimble MS, Xin JH, Guy CT, Muller WJ, Hassell JA (1993). PEA3 is overexpressed in mouse metastatic mammary adenocarcinomas. *Oncogene* **8**: 3037-42.
- Upadhyay S, Liu C, Chatterjee A, Hoque MO, Kim MS, Engles J *et al* (2006). LKB1/STK11 Suppresses Cyclooxygenase-2 Induction and Cellular Invasion through PEA3 in Lung Cancer. *Cancer Res* **66**: 7870-9.
- Urano F, Umezawa A, Hong W, Kikuchi H, Hata J (1996). A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extrasosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* **219**: 608-12.
- Vageli D, Ioannou MG, Koukoulis GK (2009). Transcriptional activation of hTERT in breast carcinomas by the Her2-ER81-related pathway. *Oncol Res* **17**: 413-23.
- Vega S, Morales AV, Ocana OH, Valdes F, Fabregat I, Nieto MA (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* **18**: 1131-43.
- Veltmaat JM, Mailleux AA, Thiery JP, Bellusci S (2003). Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation* **71**: 1-17.

- Vermot J, Schuhbauer B, Le Mouellic H, McCaffery P, Garnier JM, Hentsch D *et al* (2005). Retinaldehyde dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine brachial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development* **132**: 1611-21.
- Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J *et al* (2009). A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **11**: 943-50.
- Vinothkumar S, Rastegar S, Takamiya M, Ertzer R, Strahle U (2008). Sequential and cooperative action of Fgfs and Shh in the zebrafish retina. *Dev Biol* **314**: 200-14.
- Visvader JE (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* **23**: 2563-77.
- Wade PA (2001). Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* **10**: 693-8.
- Watson CJ, Khaled WT (2008). Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* **135**: 995-1003.
- Wechselberger C, Ebert AD, Bianco C, Khan NI, Sun Y, Wallace-Jones B *et al* (2001). Cripto-1 enhances migration and branching morphogenesis of mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* **266**: 95-105.
- Wei Y, Liu D, Ge Y, Zhou F, Xu J, Chen H *et al* (2008). Identification of E1AF as a target gene of E2F1-induced apoptosis in response to DNA damage. *J Biochem* **144**: 539-46.
- Weisinger K, Kayam G, Missulawin-Drillman T, Sela-Donenfeld D (2010). Analysis of expression and function of FGF-MAPK signaling components in the hindbrain reveals a central role for FGF3 in the regulation of Krox20, mediated by Pea3. *Dev Biol* **344**: 881-95.
- Wu J, Janknecht R (2002). Regulation of the ETS transcription factor ER81 by the 90-kDa ribosomal S6 kinase 1 and protein kinase A. *J Biol Chem* **277**: 42669-79.
- Xian W, Schwertfeger KL, Rosen JM (2007). Distinct roles of fibroblast growth factor receptor 1 and 2 in regulating cell survival and epithelial-mesenchymal transition. *Mol Endocrinol* **21**: 987-1000.
- Xian W, Schwertfeger KL, Vargo-Gogola T, Rosen JM (2005). Pleiotropic effects of FGFR1 on cell proliferation, survival, and migration in a 3D mammary epithelial cell model. *J Cell Biol* **171**: 663-73.
- Xie L, Law BK, Aakre ME, Edgerton M, Shyr Y, Bhowmick NA *et al* (2003). Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Res* **5**: R187-98.

- Xin JH, Cowie A, Lachance P, Hassell JA (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev* **6**: 481-96.
- Xing X, Wang SC, Xia W, Zou Y, Shao R, Kwong KY *et al* (2000). The ets protein PEA3 suppresses HER-2/neu overexpression and inhibits tumorigenesis. *Nat Med* **6**: 189-95.
- Yamamoto H, Horiuchi S, Adachi Y, Taniguchi H, Nosho K, Min Y *et al* (2004). Expression of ets-related transcriptional factor E1AF is associated with tumor progression and over-expression of matrilysin in human gastric cancer. *Carcinogenesis* **25**: 325-32.
- Yan J, Erdem H, Li R, Cai Y, Ayala G, Ittmann M *et al* (2008). Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression. *Cancer Res* **68**: 5460-8.
- Yang C, Chen L, Li C, Lynch MC, Brisken C, Schmidt EV (2010). Cyclin D1 enhances the response to estrogen and progesterone by regulating progesterone receptor expression. *Mol Cell Biol* **30**: 3111-25.
- Yoneshima H, Yamasaki S, Voelker CC, Molnar Z, Christophe E, Audinat E *et al* (2006). Er81 is expressed in a subpopulation of layer 5 neurons in rodent and primate neocortices. *Neuroscience* **137**: 401-12.
- Yoon KA, Chae YM, Cho JY (2009). FGF2 stimulates SDF-1 expression through the Erm transcription factor in Sertoli cells. *J Cell Physiol* **220**: 245-56.
- Yu M, Yang XY, Schmidt T, Chinenov Y, Wang R, Martin ME (1997). GA-binding protein-dependent transcription initiator elements. Effect of helical spacing between polyomavirus enhancer a factor 3(PEA3)/Ets- binding sites on initiator activity. *J Biol Chem* **272**: 29060-7.
- Yu Q, Geng Y, Sicinski P (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* **411**: 1017-21.
- Zavadil J, Bottinger EP (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**: 5764-74.
- Zhang Z, Sui P, Dong A, Hassell J, Cserjesi P, Chen YT *et al* (2010). Preaxial polydactyly: interactions among ETV, TWIST1 and HAND2 control anterior-posterior patterning of the limb. *Development* **137**: 3417-26.
- Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Zhang ZG, Lu QE, Chopp M (2009). ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation. *Cancer Biol Ther* **8**: 1045-54.
- Zhu X, Jiang J, Shen H, Wang H, Zong H, Li Z *et al* (2005). Elevated beta1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells. Identification of E1AF as important transcription activator. *J Biol Chem* **280**: 12503-16.

- Zhu Y, Guthrie S (2002). Expression of the ETS transcription factor ER81 in the developing chick and mouse hindbrain. *Dev Dyn* **225**: 365-8.
- Znosko WA, Yu S, Thomas K, Molina GA, Li C, Tsang W *et al* (2010). Overlapping functions of Pea3 ETS transcription factors in FGF signaling during zebrafish development. *Dev Biol* **342**: 11-25.
- Zwijsen RM, Wientjens E, Klompmaker R, van der Sman J, Bernards R, Michalides RJ (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* **88**: 405-15.