



HAL
open science

Étude de la régulation de la méthylation du récepteur aux œstrogènes de type alpha dans le cancer du sein

Coralie Poulard

► **To cite this version:**

Coralie Poulard. Étude de la régulation de la méthylation du récepteur aux œstrogènes de type alpha dans le cancer du sein. Cancer. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10142 . tel-01169840

HAL Id: tel-01169840

<https://theses.hal.science/tel-01169840v1>

Submitted on 30 Jun 2015

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

soutenue publiquement le 27 septembre 2013

POULARD Coralie

**Etude de la régulation de la méthylation du récepteur aux
œstrogènes de type alpha dans le cancer du sein.**

Directrice de thèse : Muriel Le Romancer

JURY

M. Serge Lebecque, Professeur Université, Lyon 1

M. Didier Picard, Professeur Université, Genève

M. Claude Beaudoin, Professeur Université, Clermont-Ferrand 2

M. Jack-Michel Renoir, Directeur de recherche CNRS émérite, Villejuif

Mme Catherine Teyssier, Chargée de recherche Inserm, Montpellier

Mme Muriel Le Romancer, Chargée de recherche Inserm, Lyon

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles

Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Didier Picard et le Professeur Claude Beaudoin pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir pris le temps de l'examiner. Je tiens également à remercier le Professeur Serge Lebecque de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Un grand merci au Dr Catherine Teyssier et au Dr Jack-Michel Renoir pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens également à remercier le Professeur Alain Puisieux pour son accueil au sein de l'Inserm U590, qui a maintenant bien grandi et est devenu le Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon.

Merci à notre chef d'équipe, le Dr Laura Corbo, pour m'avoir accueilli dans son équipe en Master et qui m'a donné la possibilité de rester en thèse. Merci pour tes encouragements, ta gentillesse, ainsi que pour tous les bons conseils scientifiques et autres qui m'ont guidé tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse Muriel Le Romancer pour m'avoir accueilli dans son groupe et permis de mener à bien ce projet. J'ai tellement appris à tes côtés. Merci pour tes encouragements, qui m'ont été très précieux. Ton engouement scientifique si communicatif, ton dynamisme et ta patience, m'ont guidé ! Je te suis très reconnaissante de tout ce que tu m'as apporté et de la confiance que tu m'as accordée. Merci pour tous les conseils, mais également pour tous les bons moments passés ensemble, et à venir je l'espère !

Merci au Docteur Vincent Cavaillès et au Docteur Jean-Marc Vanacker d'avoir accepté de faire parti de mon comité de thèse, de m'avoir permis de faire le point chaque année sur l'avancé de mes travaux et des précieux conseils que vous nous avez donnés.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Isabelle Treilleux pour son aide durant ma thèse. Merci beaucoup pour votre aide dans les projets ainsi que pour la relecture de mon manuscrit. Merci aussi à Sophie Leon et Amélie Colombe pour votre réactivité, toutes les lames coupées, votre gentillesse et votre soutien. Un petit passage dans vos « locaux » était toujours un bon moment.

Merci au Docteur Olivier Trédan d'avoir pris le temps de participer à ce travail de recherche, ainsi qu'au Docteur Thomas Bachelot.

Merci au Service d'analyse biostatistique de l'UBET, plus particulièrement à Emilie Lavergne et Sylvie Chabaud pour les différentes études statistiques qui ont apporté un plus dans ce travail. Merci pour votre gentillesse et votre pédagogie dans un domaine qui n'était pas toujours simple à déchiffrer pour une novice !

Un énorme merci au Dr Juliette Rambaud. Même si tu es arrivée dans l'équipe il y a moins de deux ans, j'ai souvent l'impression que tu as toujours été avec nous ! Merci pour ta gentillesse, ton soutien, tes conseils avisés de manip, pour le choix du post-doc ou pour la relecture de ma thèse. Merci à toi, experte de la souris, de m'avoir enseigné avec tant de patience à « travailler » sur ce modèle. Je te souhaite une bonne continuation dans l'équipe et j'espère que tout ira comme tu le veux pour la suite. Et n'oublie pas de traverser l'Atlantique avec ta petite famille pour un périple californien !

Merci à tous les membres de l'équipe de Laura.

Un grand merci à Farida Nasri. Jamais énervée, toujours souriante, notre rayon de soleil du mardi. Merci pour toutes les solutions que tu nous fais, les plasmides, mais aussi pour ton écoute et nos grandes discussions... Merci aussi à Cécile Languilaire pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton aide technique.

Merci à Julien Jacquemetton pour ton aide. Je suis sûre que la méthylation te portera chance. Bon envol ! Merci aussi à Soleilmane Omarjee. Je vous souhaite une bonne continuation dans l'équipe et pleins de beaux papiers.

Merci à Lauredana D'amato, bon rétablissement et que tout aille bien pour toi.

Parmi les anciens, merci à Katia Bouchekioua-Bouzaghrou pour m'avoir formé lors de mon stage de Master 1, et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite que ce soit sur le plan personnel que scientifique.

Merci à Stéphanie Sentis pour ses conseils précieux, sa rigueur scientifique et son soutien, particulièrement en début de thèse. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle équipe.

Merci à Chloé kolytcheff et Amandine Philippat pour votre bonne humeur, votre aide et les bons moments, ainsi qu'à Kamel Chettab, Nicolas Leconte et aux stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler, Elodie, Marine et Marion. Bonne continuation pour la suite.

Merci au Professeur Pascale Cohen et à son groupe ; Julie Vendrell, Paul Vilquin, Nhan Nguyen et Aurélie Bellanger pour votre gentillesse et votre aide scientifique.

Parmi mes coéquipiers de labeur, merci à la dream team, Laurent Fattet, Clément Chapat et Marion Chapellier. Après les galères de M2, la MRT, la thèse, le post-doc nous attend : Laurent à San diego, Clément à Montréal et Marion en Suède ! Ca va c'est pas trop mal. Merci pour votre aide, vos encouragements, votre soutien scientifique ou moral et les bons moments passés ensemble. A bientôt vers de nouveaux horizons !

Merci aux Dr Véronique Maguer-Satta et au Dr Ruth Rimokh pour leurs conseils ainsi qu'aux membres de leurs équipes. Merci aussi à Thibaut, Ivan, Julien, Philippe, Jonathan, Benjamin, Mathieu, Stéphane, Adrien, Delphine, Bastien, Sandrine, Flora, Elodie, Xenia, Sophie. Un merci tout particulier à Rudy, toujours là pour nous remonter le moral avec une petite blague. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite et de bonheur.

Merci à Céline, le rayon de soleil du matin, avec toujours un petit mot gentil. Merci aussi à Cidem, efficace en toutes circonstances, ainsi qu'à Sophie, Basma, Julie, Blandine ou encore Nathalie.

Un merci tout particulier à Nelly pour ton soutien, ta gentillesse et tes encouragements. C'était super de savoir que tu étais un étage plus bas! Je te souhaite une belle carrière. Merci aussi à Amélien, Nadège, Céline, Rémy et tous les membres du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, avec qui j'ai passé d'excellentes années.

Un grand merci à Caterina Donini, Daphné Blanchard et Alexia de Gasperi. Le temps où nous étions toutes au quatrième est bien loin mais je suis heureuse de pouvoir vous compter dans mes amies. Merci pour vos encouragements et tous les bons moments passés et à venir. Je suis très contente de vous avoir rencontré !

Enfin, merci au département de pharmacie, plus particulièrement à Caroline Moyret-Lalle, Marie Villedieu et Stéphanie Sentis qui m'ont transmis leur amour de l'enseignement, ainsi qu'à Evelyne Grisard pour son aide technique et sa gentillesse.

Un grand merci à ma famille, ma belle famille et mes précieux amis (Céline, Margaux, Flo, Greg, Lolo, Sabine et tous les autres) pour leur soutien et leur encouragement. Un merci tout particulier à Zyg qui me soutiens et me supporte au quotidien !

Je tiens aussi à remercier sincèrement les organismes qui ont soutenu financièrement ma thèse, particulièrement la fondation ARC pour avoir financé ma quatrième année.

Sommaire

| | |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Remerciements..... | 1 |
| Sommaire | 4 |
| Publications | 7 |
| Liste des figures ou tableaux | 9 |
| Liste des abréviations..... | 11 |
| Avant-propos | 12 |
| A- Introduction générale | 15 |
| Chapitre 1 : Le cancer du sein | 17 |
| I- En quelques chiffres..... | 17 |
| II- La glande mammaire..... | 18 |
| 1. Anatomie de la glande | 18 |
| a- Le compartiment épithélial..... | 18 |
| b- Le compartiment mésenchymateux | 19 |
| 2. Développement de la glande | 19 |
| III- La pathologie du cancer du sein..... | 20 |
| 1. Critères histologiques | 20 |
| 2. Critères anatomopathologiques | 21 |
| a- Le stade de la tumeur (Classification TNM) | 22 |
| b- Le grade histopronostique de Scarff, Bloom et Richardson (SBR) | 24 |
| 3. Critères moléculaires | 25 |
| a- Récepteurs hormonaux..... | 25 |
| b- Les récepteurs HER | 26 |
| c- Ki67 | 27 |
| 4. Analyse du transcriptome | 28 |
| IV- Origine du cancer du sein | 29 |
| 1. Facteurs génétiques..... | 30 |
| 2. Facteurs environnementaux et sanitaires..... | 30 |
| a- Radiations ionisantes | 30 |
| b- Obésité, densité mammographique et taille | 30 |
| c- Activité physique..... | 31 |
| d- Cigarette, alcool et déterminants nutritionnels..... | 31 |
| 3. Facteurs hormonaux et liés à la reproduction | 32 |
| 4. Les cellules souches cancéreuses..... | 33 |
| Chapitre 2 : Le récepteur aux œstrogènes..... | 35 |
| I- Les œstrogènes | 35 |
| 1. Biosynthèse et métabolisme des œstrogènes | 35 |
| 2. Le cycle hormonal | 36 |
| 3. Physiologie des œstrogènes..... | 38 |
| II- Le récepteur aux œstrogènes | 39 |
| 1. Structure | 40 |
| a- Organisation génique..... | 40 |
| b- Organisation protéique..... | 40 |

| | | |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 2. | Les isoformes de ER | 43 |
| III- | Mode d'action du récepteur aux œstrogènes | 44 |
| 1. | Maintien de l'état inactif de ER α en absence de ligand | 45 |
| 2. | Les voies génomiques de ER α | 46 |
| a- | La voie classique | 46 |
| b- | La voie non classique | 50 |
| c- | La voie indépendante des œstrogènes | 52 |
| 3. | Les voies non génomiques de ER α | 53 |
| a- | La nature du récepteur | 53 |
| b- | Les protéines partenaires | 57 |
| c- | La signalisation non génomique et ses effets | 58 |
| IV- | Les modifications post-traductionnelles de ER α | 61 |
| 1. | Les PTM qui régulent les voies génomiques de ER α | 61 |
| a- | Phosphorylation | 61 |
| b- | Acétylation | 62 |
| c- | Ubiquitinylation | 62 |
| d- | Sumoylation | 63 |
| e- | Méthylation sur lysine | 65 |
| 2. | Les PTM qui régulent les voies non génomiques de ER α | 65 |
| 3. | Les PTM dérégulées dans les tumeurs du sein | 66 |
| a- | La sérine 118 | 67 |
| b- | La sérine 167 | 67 |
| c- | L'arginine 260 | 67 |
| d- | La lysine 303 | 67 |
| e- | La sérine 305 | 68 |
| 4. | Les PTM affectant les corégulateurs de ER α | 68 |
| a- | Le coactivateur SRC-3 | 69 |
| b- | Le corépresseur RIP140 | 70 |
| Chapitre 3 : Thérapies et mécanismes de résistance | | 73 |
| I- | Les traitements du cancer du sein | 73 |
| 1. | La chirurgie | 73 |
| 2. | La radiothérapie | 73 |
| 3. | La chimiothérapie | 74 |
| 4. | Les thérapies ciblées | 74 |
| a- | L'hormonothérapie | 74 |
| b- | Les inhibiteurs de la voie mTor | 77 |
| c- | Les anticorps monoclonaux humanisés | 79 |
| II- | Les mécanismes de résistance aux traitements | 80 |
| 1. | Résistance à l'hormonothérapie | 81 |
| a- | La signalisation des facteurs de croissance | 81 |
| b- | Implication de ER α | 83 |
| c- | Implication d'autres isoformes | 85 |
| d- | Hypersensibilité aux œstrogènes | 85 |
| e- | Mécanismes pharmacogénomiques | 86 |
| 2. | Résistance aux inhibiteurs de mTor | 87 |
| 3. | Résistance au Trastuzumab | 87 |

| | | |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----|
| a- | Problèmes stériques | 88 |
| b- | Surexpression de récepteurs à tyrosine kinases | 89 |
| c- | Altérations intracellulaires | 89 |
| Chapitre 4 : | La méthylation sur arginine | 91 |
| I- | Généralités | 91 |
| II- | Le processus de méthylation sur arginine..... | 92 |
| 1. | Les enzymes | 92 |
| a- | La famille des PRMT (proteïn arginine methyltransferase)..... | 92 |
| b- | Spécificité de substrats | 96 |
| c- | Structures..... | 96 |
| 2. | PRMTs et cancer | 98 |
| III- | Régulation de la méthylation sur arginine | 102 |
| 1. | Interactions protéiques..... | 103 |
| 2. | Modifications post-traductionnelles | 105 |
| a- | Les PTM affectant les PRMTs | 105 |
| b- | Les PTM affectant la méthylation sur arginine | 105 |
| 3. | Les microRNAs (miRNAs)..... | 106 |
| 4. | Réversion de la méthylation | 107 |
| a- | Les déiminases | 107 |
| b- | Les déméthylases | 109 |
| B- Résultats..... | 115 | |
| I- | Les voies non génomiques mER α /Src/PI3K dans le cancer du sein | 118 |
| a- | Introduction | 118 |
| b- | Article 1 | 121 |
| c- | Discussion | 123 |
| II- | LKB1, partenaire du complexe mER α /Src/PI3K..... | 127 |
| a- | Introduction | 127 |
| b- | Article 2 | 135 |
| c- | Discussion | 157 |
| III- | JMJD6 déméthylase de ER α | 161 |
| a- | Introduction | 161 |
| b- | Article 3 | 163 |
| c- | Discussion | 181 |
| IV- | Résultats complémentaires | 185 |
| C- Discussion générale et perspectives..... | 189 | |
| Annexes..... | 197 | |
| A - | Revue 1 | 197 |
| B - | Revue 2 | 199 |
| C - | Revue 3 | 217 |
| Références bibliographiques | 219 | |

Publications

Articles scientifiques

1/ *"Estrogenic non genomic signaling is activated in aggressive human breast carcinoma"*.

EMBO Molecular Medicine. 2012 Nov;4(11):1200-13.

Poulard C*, Treilleux I*, Lavergne E, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard-Léon S, Chabaud S, Tredan O, Corbo L and Le Romancer M. * Egale contribution

2/ *"LKB1, a two-faced Janus marker of Breast Cancer"*.

Bouchekioua-Bouzaghrou K*, **Poulard C***, Rambaud-Arnaud J, Treilleux I, Lavergne E, Hussein N, Bachelot T, Billaud M, Mader S, Corbo L and Le Romancer M. * Egale contribution
(Soumis à International Journal of Cancer).

3/ *"ER α is regulated by the arginine demethylase JMJD6"*.

Poulard C, Rambaud-Arnaud J, Hussein N, Corbo L and Le Romancer M.
(En préparation de soumission).

Revue

1/ *"Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors"*

Endocrine Reviews. 2011 Oct, 32(5):597-622.

Le Romancer M, **Poulard C**, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L.

2/ *"Post-transcriptional Modifications of ER Alpha in Rapid Estrogen's Action"*,

Extrait du livre "Advances in Rapid Sex-Steroid Action". Springer Science. 2012.

Le Romancer M, **Poulard C**, Sentis S, Corbo L.

3/ *"Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors."*

Medicine Science. 2010 Jun-Jul, 26(6-7):636-40.

Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Le Romancer M.

Participations aux congrès

Présentation orale

Congrès du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, le 3 Octobre 2012. Communication orale.
“*Estrogenic non genomic signaling is activated in aggressive human breast carcinoma*”. **Poulard C.**

Posters

- EMBO Nuclear receptors (Sitges, Espagne, du 16 au 20 Septembre 2011).

“*Estrogenic non genomic signalling occurs in human breast tissue and is deregulated in breast tumors*”.

Poulard C, Treilleux I, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard-Léon S, Corbo L and Le Romancer M.

- Conference « CLARA » (Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes) du 28 au 29 Mars 2011, Lyon.

“*In situ detection of protein complexes involved in estrogen non genomic signaling in breast tumors*”.

Poulard C, Treilleux I, Sophie Goddard-Léon, Laura Corbo and Muriel Le Romancer

- Congrès de recherche translationnel du Centre léon Bérard, le 17^{ème} Février 2011, Lyon. Prix du meilleur poster.

“*In situ detection of protein complexes involved in estrogen non genomic signaling in breast tumors*”.

Poulard C, Treilleux I, Sophie Goddard-Léon, Laura Corbo and Muriel Le Romancer

- Conference « CLARA » (Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes) du 30 au 31 Mars 2010, Lyon.

“*The arginine demethylase, JMJD6, is involved in estrogen non genomic signaling.*”

Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L and Le Romancer M.

Liste des figures ou tableaux

Figures

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figure 1 : Anatomie de la glande mammaire..... | p18 |
| Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'un canal de glande mammaire..... | p19 |
| Figure 3 : Les adénocarcinomes..... | p21 |
| Figure 4 : Représentation des tailles des tumeurs du sein selon la classification TNM..... | p23 |
| Figure 5 : La voie de signalisation de HER-2..... | p27 |
| Figure 6 : Différenciation mammaire normale et tumorale..... | p33 |
| Figure 7 : La synthèse des œstrogènes..... | p36 |
| Figure 8 : Le cycle menstruel..... | p37 |
| Figure 9 : Effets des œstrogènes..... | p38 |
| Figure 10 : Organisation génique et protéique des ERs..... | p40 |
| Figure 11 : Structure du domaine de liaison à l'ADN..... | p41 |
| Figure 12 : Les isoformes de ER..... | p43 |
| Figure 13 : Les voies de signalisation de ER..... | p44 |
| Figure 14 : Modèle simplifié du maintien de ER α dans un état inactif..... | p45 |
| Figure 15 : Mécanismes d'action des coactivateurs de ER α | p47 |
| Figure 16 : Mécanismes d'action des coactivateurs de ER α | p50 |
| Figure 17 : La voie génomique non classique des œstrogènes..... | p51 |
| Figure 18 : La signalisation de GPR30..... | p55 |
| Figure 19 : Les voies de signalisation non génomiques..... | p59 |
| Figure 20 : Les modifications post-traductionnelles de ER α | p61 |
| Figure 21 : Le processus d'ubiquitylation..... | p63 |
| Figure 22 : Le processus de sumoylation..... | p63 |
| Figure 23 : Modèle intégrant les PTM impliquées dans les voies non génomiques..... | p66 |
| Figure 24 : Les PTM affectant SRC-3..... | p69 |
| Figure 25 : Les PTM affectant RIP140..... | p71 |
| Figure 26 : La structure des anti-œstrogènes..... | p75 |
| Figure 27 : Les mécanismes d'action des anti-œstrogènes..... | p76 |
| Figure 28 : La voie mTor..... | p78 |
| Figure 29 : Les mécanismes d'action du Trastuzumab..... | p79 |
| Figure 30 : Modèle d'une cellule tumorale résistante au tamoxifène dans laquelle la signalisation des facteurs de croissance est dérégulée..... | p82 |
| Figure 31 : CUEDC2 régule l'expression de ER α dans les cellules tumorales..... | p83 |
| Figure 32 : Conversion du tamoxifène en métabolite actif..... | p86 |
| Figure 33 : Les mécanismes de résistance au Trastuzumab..... | p88 |
| Figure 34 : Le processus de méthylation sur lysine..... | p91 |
| Figure 35 : Les PTM affectant les histones H3 et H4..... | p92 |
| Figure 36 : Le processus de méthylation sur arginine..... | p93 |
| Figure 37 : Les 11 membres de la famille des PRMTs..... | p97 |
| Figure 38 : La méthylation par PRMT1 bloque la phosphorylation induite par AKT..... | p99 |
| Figure 39 : Les protéines régulatrices de PRMT1..... | p103 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Figure 40 : Les protéines régulatrices de PRMT5..... | p104 |
| Figure 41 : Les PTM régulant la méthylation sur arginine des histones..... | p106 |
| Figure 42 : La processus de déméthylimination..... | p108 |
| Figure 43 : Le processus de déméthylation sur lysine..... | p110 |
| Figure 44 : Représentation schématique des domaines de JMJD6..... | p112 |
| Figure 45 : La technologie du Duolink (PLA : « Proximity Ligation Assay »)..... | p119 |
| Figure 46 : Les modifications post-traductionnelles de LKB1..... | p129 |
| Figure 47 : Rôle de LKB1 dans la voie mTor..... | p130 |
| Figure 48 : Quelques effets anti-œstrogéniques de LKB1..... | p132 |
| Figure 49 : Localisation de JMJD6 dans les cellules MCF-7..... | p181 |
| Figure 50 : Analyse de l'interaction ER α /Src sur des xénogreffes de tumeurs de sein humaines en Duolink | p185 |
| Figure 51 : Etude du complexe ER α /Src/PI3K dans un modèle de xénogreffes résistant au tamoxifène | p186 |
| Figure 52 : Interaction ER α /Src dans le modèle résistant au tamoxifène après différents traitements | p187 |
| Figure 53 : Modèle intégratif de la signalisation non génomique œstrogéno-dépendante dans les cellules tumorales..... | p192 |

Tableaux

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tableau 1 : Description de la classification TNM (Tumor Node Metastasis)..... | p22 |
| Tableau 2 : Les stades tumoraux découlant la classification TNM..... | p23 |
| Tableau 3 : Grade SBR modifié par Elston et Ellis..... | p24 |
| Tableau 4 : Facteurs de risque de cancer du sein..... | p32 |
| Tableau 5 : Les résidus modifiés de ER α et leurs fonctions..... | p64 |
| Tableau 6 : Analyse de corrélation entre mER α /Src/PI3K et la signalisation AKT/mTor | p124 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| AdoMet : Adenosylmethionine | LSD1 : Lysine-specific demethylase 1 |
| AMPK : AMP-activated protein kinase | MAPK : Mitogen-activated protein kinase |
| AP-1 : Activator protein 1 | MEP50 : Methylosome protein 50 |
| ATM : Ataxia-telangiectasia mutated | MMA : Monomethylation |
| ATR : ATM and Rad3-related | MMP : metalloproteinase |
| BAD : BCL2 antagonist of cell death | MO25 : Mouse Protein 25 |
| BAF : BRG1-associated factors | mTor : mammalian target of rapamycin |
| BRCA-1 : BReast CAncer 1 | N-Cor : Nuclear receptor corepressor |
| BRG-1 : Brahma-related gene 1 | NO : Nitric oxide |
| BTG1 : B-cell translocation gene 1 | p130 ^{Cas} : Crk-associated substrate |
| CARM-1 : coactivator-associated arginine methyltransferase 1 | PADI : Peptidylarginine deiminase |
| CCAR : Cell cycle and apoptosis regulator 1 | PAT : Palmitoyl acyltransférase |
| CoCoA : Coiled-coil coactivator | PDK1 : Phosphoinositide dependant protein kinase 1 |
| Co-REST : Corepressor RE1-Silencing Transcription factor | PI3K : Phosphoinositide 3-kinase |
| CSC : Cellules souches cancéreuses | Pin1 : Peptidyl-prolyl isomerase-1 |
| CtBP : Carboxyl-terminal Binding Protein | PIP3: phosphatidylinositol tri-phosphate |
| DBD : DNA binding domain | PJS : Syndrome de Peutz-Jeghers |
| sDMA : Symetric diméthylation | PKA : Protein kinase A |
| aDMA : Asymetric diméthylation | PKC : Protein kinase C |
| E ₂ : œstradiol | PLA : Proximity Ligation Assay |
| EGF : Epidermal growth factor | PLC : phospholipase C |
| EMT : Epithelial mesenchymal transition | PR : Progesterone Receptor |
| ER : Récepteurs aux œstrogènes | PSR : Phosphatidylserine Receptor |
| ERE : Estrogens response elements | PTEN : Phosphatase and TENsin homolog |
| FAK : Focal adhesion kinase | PTM : Modifications post-traductionnelles |
| FIH : Factor inhibiting HIF | PRMT : Protein arginine methyltransferase |
| Fli-1 : Flightless-1 | RIP140 : Receptor-interacting protein of 140kDa |
| FSH : Follicule stimulating hormone | RTK : Récepteurs à tyrosine kinase |
| GnRH : Gonadotropin releasing hormone | SERM : Selective œstrogen receptor modulator |
| GPR30 : G protein-coupled receptor 30 | SERD : Selective œstrogen receptor downregulators |
| GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3 | Shc : Src-homology and collagen homology |
| HAT : Histone acetyltransférase | SHP : Short heterodimer partner |
| HB-EGF : Heparin binding epidermal growth factor | SMRT : Silencing mediator of retinoid and thyroid receptors |
| hCAF1 : CCR4-associated factor 1 | snRNP : Small nuclear ribonucleoprotein |
| HDAC : Histone deacetylase | Sp-1 : Specificity protein 1 |
| HER-2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 | SRC : Steroid receptor coactivator |
| Hsp : Heat shock protein | STRAD : Ste-20 Related ADaptator |
| IGF : Insulin-like growth factor | Tam : Tamoxifène |
| JMJD6 : Jumonji domain-containing 6 protein | TDRD3 : Tudor domain-containing protein 3 |
| KO : Knock-out | TMA : Tissu Micro Array |
| LBD : Ligand binding domain | U2AF65 : U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 65-kDa |
| LH : Luteinizing hormone | VEGF : Vascular endothelial growth factor |

Avant-propos

Il y a de cela quelques mois, la double mastectomie d'Angelina Jolie, annoncée dans les colonnes du New York Times, a fait la « Une » des magazines à travers le monde. Angelina Jolie est porteuse d'une mutation sur le gène BRCA1 (Breast cancer 1), un gène souvent altéré dans les cancers génétiques du sein. L'actrice de 38 ans a donc opté pour une mastectomie préventive afin de réduire le risque de développer un cancer du sein de 87%, à un risque moyen de 5%. Au-delà de cet évènement surmédiatisé, le débat sur la mastectomie préventive a été relancé, et plus généralement, le thème de la prévention du cancer du sein. Il existe un dépistage particulier chez les femmes pour lesquelles un risque génétique est connu. C'est d'ailleurs, la plupart du temps, lors d'un dépistage génétique positif pour la mutation génique (BRCA1 ou 2) qu'une mastectomie préventive peut être proposée. Par ailleurs, on estime à 5% le risque de développer un cancer du sein lorsque l'on n'est pas porteuse de mutation génétique, on parle alors de cancers du sein sporadiques. En France, un dépistage organisé du cancer du sein est en place pour toutes les femmes à partir de 50 ans.

Il ne faut pas oublier que le cancer du sein représente encore une cause de mortalité élevée chez la femme. Dans le cas des cancers sporadiques, il est associé à des altérations des voies de signalisation qui sont essentielles au maintien des fonctions cellulaires normales. Le cancer du sein est un cancer hormono-dépendant. De ce fait, il est extrêmement important de définir le rôle joué par les différents acteurs protéiques de la signalisation hormonale, notamment la signalisation œstrogénique, qui peut être à l'origine des dérégulations observées dans les cellules cancéreuses.

Les mécanismes d'action des œstrogènes sont complexes. Il existe une voie classique dite génomique où l'hormone lie le récepteur nucléaire et régule la transcription des gènes cibles dans le noyau en se liant sur des éléments de réponse au niveau de l'ADN, après le recrutement de protéines co-régulatrices (McDonnell et al., 2002; O'Malley et al., 2008). Parallèlement, il existe une voie dite non génomique par laquelle les œstrogènes induisent les effets plus rapides qui ont lieu dans le cytoplasme après activation d'une cascade de kinases. Dans cette voie, ER α recrute entre autre la sous-unité p85 de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) et la tyrosine kinase Src, conduisant à l'activation de molécules de signalisation telles que les MAPK et AKT, qui induisent prolifération et survie cellulaire (Castoria et al., 2001; Simoncini et al., 2000).

Notre équipe a démontré que ER α est méthylé par l'arginine méthyltransférase PRMT1. La méthylation de ER α (mER α), induite par les œstrogènes de façon rapide et transitoire a lieu dans le cytoplasme et est indispensable au recrutement du complexe mER α /Src/PI3K et à l'activation des cascades de phosphorylation *en aval*. De plus, grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique, notre équipe a démontré que la méthylation de ER α est un processus physiologique dérégulé dans les tumeurs du sein. En fait, ER α est hyperméthylé dans 50% des tumeurs mammaires humaines.

L'objectif de mon projet de thèse était donc de disséquer les mécanismes moléculaires régulant la méthylation de ER α dans les cancers du sein. Dans une première partie, je ferai un état des lieux des données bibliographiques sur le sujet autour de 4 grands axes, (i) le cancer du sein, (ii) le récepteur aux œstrogènes, (iii) les thérapies et les mécanismes de résistance et (iv) la méthylation des protéines sur arginines. Ensuite mes résultats seront présentés sous forme d'articles insérés dans ma thèse. Pour chaque article, je ferai une introduction et discuterai les résultats obtenus. Des résultats complémentaires étayeront ma discussion finale et permettront de présenter le bilan de mon travail de thèse ainsi que les perspectives.

A- Introduction générale

Chapitre 1 : Le cancer du sein

I- En quelques chiffres

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans l'Union européenne et aux Etats-Unis. En France, 53 000 nouveaux cas ont été dénombrés en 2011, ce qui représente 33% de nouveaux cas de cancers. Toutefois, son incidence tend à diminuer, même s'il reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme avec 11 500 décès par an. Le cancer du sein demeure donc toujours un problème majeur de santé publique. On estime qu'à l'heure actuelle une femme sur 9 développera un cancer du sein au cours de sa vie et qu'une femme sur 27 en mourra (Institut National du Cancer, INCa : <http://www.e-cancer.fr>).

En France, l'incidence du cancer du sein a très fortement augmenté entre 1980 et 2005. Elle a presque doublé passant de 56,8 à 99,7 cas pour 100 000. Inversement, le taux de mortalité par cancer a baissé de 13% en France dans cette même période. Les évolutions inverses de la mortalité et de l'incidence du cancer du sein au cours de ces dernières années pourraient s'expliquer par un dépistage plus précoce de la maladie et par l'amélioration des traitements.

La survie relative à 5 ans varie avec le stade du cancer au moment du diagnostic, elle est de 98% pour un stade très précoce avec une tumeur localisée, inférieure à 80% pour un stade plus tardif avec envahissement ganglionnaire et de 23% lorsque la tumeur s'est disséminée dans les organes distants (Horner MJ et al., 2009).

La mammographie demeure l'examen de référence en matière de dépistage du cancer du sein chez la femme. En France, un programme national de dépistage organisé a été instauré par les pouvoirs publics pour les femmes de 50 à 74 ans. Dans le cadre de ce programme, la population cible est invitée à bénéficier tous les 2 ans d'un examen clinique des seins par un radiologue agréé ainsi que d'une mammographie de dépistage. On estime d'ailleurs que la tumeur peut être détectée 1,7 ans avant que la femme ne ressente une grosseur. Cependant, certaines tumeurs de petites tailles peuvent présenter un potentiel métastatique important, et ces tumeurs restent incurables (Steeg et al., 2006).

On peut aussi noter que le cancer du sein peut apparaître chez l'homme, mais c'est relativement rare avec moins de 1% des cancers du sein, laissant plutôt suspecter une origine génétique.

II- La glande mammaire

1. Anatomie de la glande

La glande mammaire est une glande exocrine qui a pour fonction de produire le lait pour le nouveau né (**Figure 1A**). Deux compartiments cellulaires constituent la glande : l'épithélium et le stroma environnant.

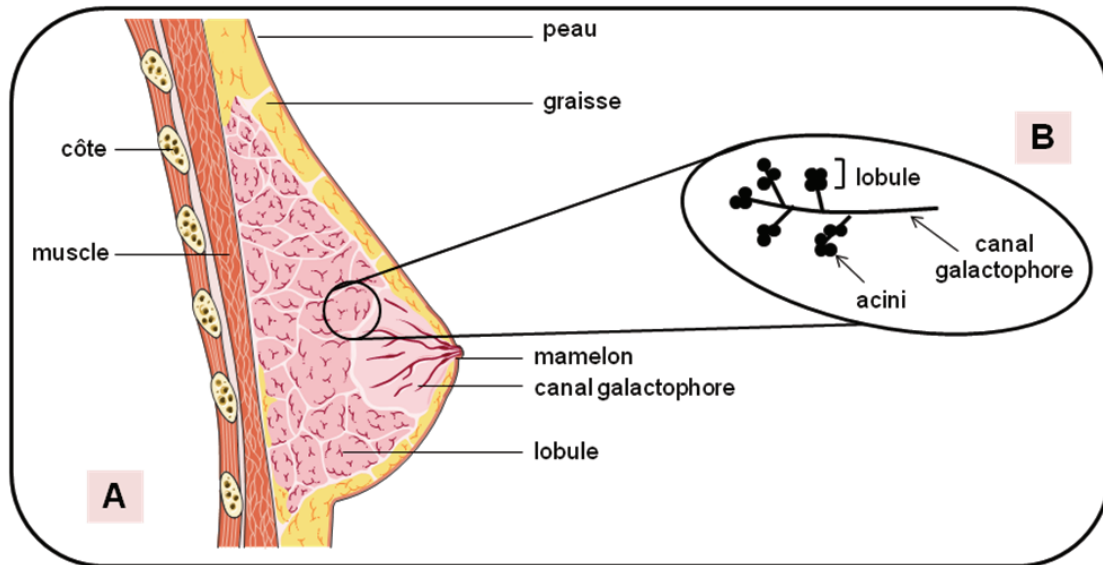


Figure 1 : Anatomie de la glande mammaire

A : Schéma d'une coupe transversale du sein.

B : Représentation schématique d'un groupement de lobules

a- Le compartiment épithélial

Le compartiment épithélial comprend un réseau d'une vingtaine de lobes constitués de lobules faits d'acini qui fabriquent le lait en période d'allaitement et des canaux galactophores, qui ont pour fonction de transporter le lait vers le mamelon (**Figure 1B**).

Les lobules et les canaux sont composés de deux types cellulaires différenciés, les cellules luminales et les cellules myoépithéliales. Les cellules luminales bordent la lumière des canaux et des lobules. Les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact avec la membrane basale et le stroma environnant (**Figure 2**) (Hennighausen et al., 2005; Rudland et al., 1995). On peut ajouter la présence de cellules souches et de progéniteurs plus ou moins engagés dans une voie de différenciation. Ces cellules sont en position basale ou supra-basale, très probablement au niveau de niches spécialisées. L'orientation d'un progéniteur épithélial bipotent vers le lignage luminal ou myoépithélial pourrait être sous le contrôle de gènes « maîtres », tels que GATA3 pour le lignage luminal (Asselin-Labat et al., 2007; Kouros-Mehr et al., 2006).

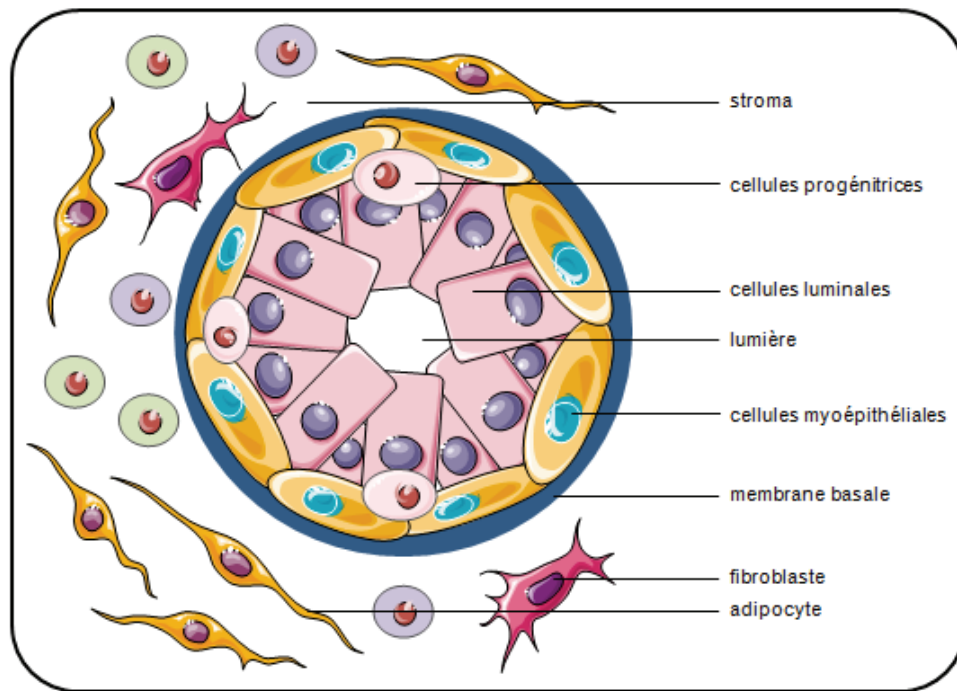


Figure 2 : Représentation schématique d'une coupe transversale d'un canal de glande mammaire

Le compartiment épithélial est séparé du compartiment mésenchymateux (stroma) par la membrane basale.

b- Le compartiment mésenchymateux

Le stroma quant à lui est principalement constitué d'adipocytes, mais on dénombre aussi des fibroblastes, des nerfs, des vaisseaux sanguins ainsi que des vaisseaux lymphatiques dont la majorité se jettent dans les ganglions axillaires (Hennighausen et al., 2005; Rudland et al., 1995). Les vaisseaux lymphatiques drainent et acheminent les débris et déchets cellulaires dans les ganglions lymphatiques. De ce fait, lors d'un cancer du sein, les cellules tumorales issues de l'épithélium mammaire peuvent parcourir le système lymphatique jusqu'aux ganglions lymphatiques où elles prolifèrent. C'est la première étape vers le développement de métastases (Fisher et al., 1967). Pour cette raison, la présence de cellules tumorales au niveau du ganglion sentinelle, le premier ganglion drainant la tumeur, participe au pronostic du cancer (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group., 2012).

2. Développement de la glande

La glande mammaire débute son développement durant la vie embryonnaire et se poursuit tout au long de la vie de la femme. Sa principale poussée de croissance arrive avec la formation des lobules à la puberté, mais le développement et la différenciation du sein n'est complète qu'à la fin de la première grossesse à terme.

La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence d'une multitude d'hormones parmi lesquelles les hormones sexuelles ovariennes (œstrogènes et progestérone), la prolactine et des facteurs de croissance tels que l'hormone de croissance et l'EGF (« Epidermal Growth Factor »).

Les œstrogènes permettent notamment le développement de la glande mammaire à la puberté, stimulent les canaux galactophores lors du cycle menstruel. Ils jouent un rôle important tout au long de la grossesse. La progestérone, complémentaire de l'action des œstrogènes, joue un rôle dans la différenciation des cellules du sein et sur le cycle menstruel. Chez la femme enceinte, l'augmentation de la concentration de ces deux hormones induit la multiplication et le développement des acini qui passent de 6 000 à 20 000 unités.

La prolactine est sécrétée par l'hypophyse à l'accouchement suite à une chute du taux d'œstrogènes et de progestérone. Elle induit la production de lait par les acini. (McCave et al., 2010; Parmar et al., 2004; Rudland et al., 1995).

III- La pathologie du cancer du sein

Le cancer du sein englobe un groupe hétérogène de tumeurs avec diverses caractéristiques morphologiques et biologiques, dont le comportement et la réponse aux traitements varient (Rakha et al., 2011). La découverte d'un cancer du sein est souvent due à des symptômes cliniques (douleurs, masse palpable). Une série d'examen (mammographie, échographie, biopsie) permet de poser le diagnostic. Cependant, seul l'examen histologique de la biopsie peut confirmer avec certitude la présence d'un cancer infiltrant. La gestion clinique actuelle du cancer du sein repose sur la disponibilité de solides facteurs pronostics et prédictifs pour soutenir la prise de décision et adapter le choix du traitement vers la chirurgie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie ou la radiothérapie. Les facteurs pronostics sont associés à la précocité du diagnostic, au type histologique de la tumeur, à son examen anatomopathologique, et à ses caractéristiques moléculaires. Ils sont brièvement exposés ci-dessous.

1. Critères histologiques

Les cancers du sein les plus fréquents (95%) sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire qu'ils se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. La classification histologique divise les tumeurs en deux catégories : les adénocarcinomes *in situ* (non infiltrants) généralement associés à un bon pronostic et les adénocarcinomes infiltrants qui ont un pronostic moins favorable. Un adénocarcinome qui naît à partir des canaux est appelé canalaire (75%). Il est dit lobulaire s'il se développe à partir des lobules (10% seulement) (**Figure 3**).

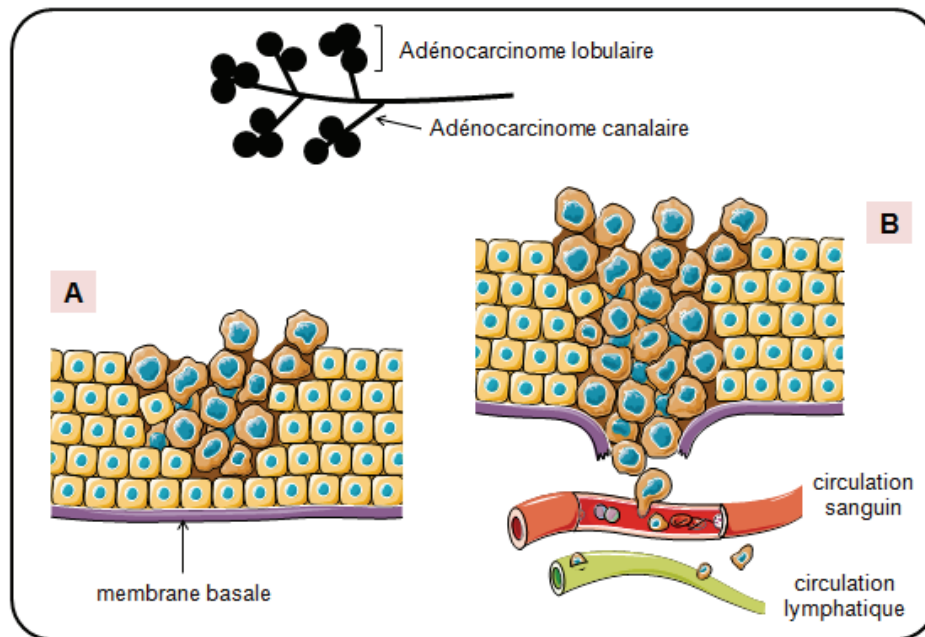


Figure 3 : Les adénocarcinomes

Ils sont de différents types suivant le lieu de développement de l'adénocarcinome (lobulaire et canalaire) et se divisent en 2 catégories. **A** : Adénocarcinome *in situ* (non infiltrants). **B** : Adénocarcinome infiltrant

On parle d'adénocarcinome *in situ* lorsque les cellules cancéreuses se trouvent à l'intérieur des canaux ou des lobules sans que la tumeur n'ait franchi la membrane basale qui l'entoure. (**Figure 3A**). Lorsque les cellules cancéreuses ont franchi la membrane basale et ont infiltré le tissu qui entoure les canaux et les lobules, on parle d'adénocarcinomes infiltrants. Les cancers infiltrants se propagent généralement vers les ganglions lymphatiques (**Figure 3B**).

Il existe de nombreux autres types de cancers du sein beaucoup plus rares, aux particularités histologiques spécifiques. On retrouve entre autres les carcinomes médullaires, mucineux, tubuleux, papillaires et la maladie de Paget du mamelon, aux pronostics plus ou moins favorables.

2. Critères anatomopathologiques

Lorsque le diagnostic de cancer est confirmé, la stratégie thérapeutique est guidée par le stade de la maladie et par les facteurs pronostics (Elston et al., 1999). Le stade de la tumeur dépend de sa taille, de son caractère infiltrant ou non, de l'envahissement ganglionnaire et de la présence ou non de métastases. Le grade de la tumeur évalue son agressivité. Il prend en compte la différenciation des cellules tumorales et leur vitesse de croissance.

a- Le stade de la tumeur (Classification TNM)

Le système de classification des différents stades du cancer du sein, appelé classification TNM a été établi par l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). La classification TNM (« Tumor, Nodes, Metastasis ») est basée sur l'analyse de la taille de la tumeur (T), la présence ou l'absence d'envahissement ganglionnaire (N) et la présence ou l'absence de métastase (M) (**Tableau 1, Figure 4**). Ces critères permettent ensuite de subdiviser les tumeurs en 5 stades (**Tableau 2**).

| T : Taille de la tumeur | | |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Tx | La taille de la tumeur ne peut pas être évaluée | |
| T0 | Pas d'identification de tumeur primaire | |
| Tis | Carcinome in situ | |
| | Tis (DCIS) | Carcinome <i>in situ</i> canalaire |
| | Tis (LCIS) | Carcinome <i>in situ</i> lobulaire |
| | Tis (Paget's) | Maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente |
| T1 | Tumeur inférieure ou égale à deux centimètres dans sa plus grande dimension | |
| T1mi | Tumeur dont la taille est inférieure ou égale à 0,1cm dans sa plus grande dimension | |
| T1a | Tumeur dont la taille est comprise entre 0,1cm et 0,5cm dans sa plus grande dimension | |
| T1b | Tumeur dont la taille est comprise entre 0,5cm et 1cm dans sa plus grande dimension | |
| T1c | Tumeur dont la taille est comprise entre 1cm et 2cm dans sa plus grande dimension | |
| T2 | Tumeur dont la taille est comprise entre 2cm et 5cm dans sa plus grande dimension | |
| T3 | Tumeur dont la taille est supérieure à 5cm dans sa plus grande dimension | |
| T4 | Tumeur de toute taille avec une extension directe dans la paroi thoracique ou la peau | |
| T4a | Extension à la paroi thoracique | |
| T4b | Ulcération ou œdème (incluant peau d'orange) ou nodules satellites | |
| T4c | A la fois T4a et T4b | |
| T4d | Carcinome inflammatoire | |
| N : Envahissement ganglionnaire régional | | |
| Nx | L'envahissement ganglionnaire ne peut pas être évalué | |
| N0 | Pas d'envahissement ganglionnaire régional | |
| N1 | Ganglions axillaires homolatéraux mobiles | |
| N2 | Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures | |
| N3 | Ganglions mammaires internes homolatéraux | |
| M : Métastases à distance | | |
| Mx | Pas d'information clinique ou radiologique indiquant des métastases à distance | |
| M0 | Pas de métastase à distance | |
| M1 | Présence de métastases à distance | |

Tableau 1 : Description de la classification TNM (Tumor Node Metastasis)

La lettre T symbolise la tumeur initiale et est notée de T0 pour la maladie infraclinique à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette notation dépend du volume tumoral et de l'envahissement de la peau ou du muscle pectoral (T4).

La lettre N, de N0 à N3, prend en compte l'envahissement ganglionnaire.

La lettre M est notée de M0 en absence de métastase, à M1 lorsqu'il y a des métastases, quel que soit leur siège, qu'elles soient uniques ou multiples. Cette classification a été conçue pour donner aux cancérologues de tous les pays un langage commun, facilitant ainsi les échanges d'informations entre médecins et chercheurs. D'après l'American Joint Committee on Cancer 7^{ème} édition.

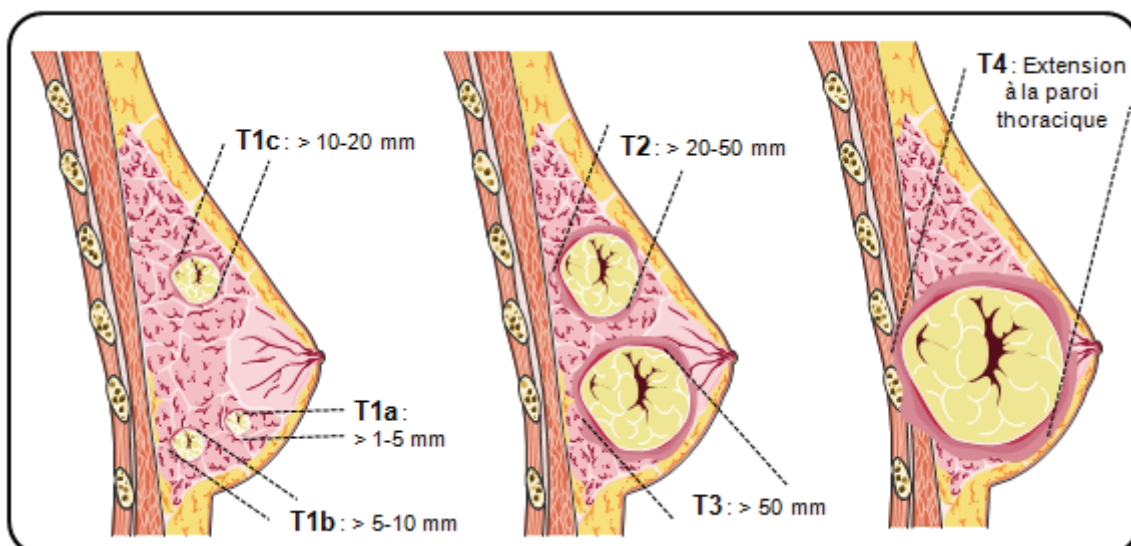


Figure 4 : Représentation des tailles des tumeurs du sein selon la classification TNM

D'après l'American Joint Committee on Cancer 7^{ème} édition.

| | | | |
|-------------------|-------|-------|----|
| Stade 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stade IA | T1 | N0 | M0 |
| Stade IB | T0 | N1 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| Stade IIA | T0 | N1 | M0 |
| | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N0 | M0 |
| Stade IIB | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Stade IIIA | T0 | N2 | M0 |
| | T1 | N2 | M0 |
| | T2 | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| Stade IIIB | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| Stade IIIC | T4 | N2 | M0 |
| | Any T | N3 | M0 |
| Stade IV | Any T | Any N | M1 |

Tableau 2 : Les stades tumoraux découlant de la classification TNM

Selon les localisations tumorales et les cotations déterminées par la classification TNM (tableau 1), la combinaison de ces trois éléments (TNM) permet d'établir un stade (de I à IV) plus synthétique.

D'après l'American Joint Committee on Cancer 7^{ème} édition

Il faut noter que l'examen clinique réalisé avant tout traitement permet de définir un stade du cancer dit stade pré-thérapeutique, on parle alors de classification cTNM (c pour clinique). Après la chirurgie, l'examen anatomopathologique des tumeurs et des ganglions prélevés permet de

définir un stade de cancer dit stade anatomopathologique, on parle alors de classification pTNM (p pour post-chirurgical). Plus le stade est élevé, moins bon est le pronostic. Au stade IV, le taux de survie à 5 ans est très faible (<20%) car le cancer du sein est métastatique.

b- Le grade histopronostique de Scarff, Bloom et Richardson (SBR)

Cette classification évalue l'agressivité des tumeurs infiltrantes. En effet, tous les cancers n'ont pas la même agressivité. Les tumeurs sont considérées de bon pronostic lorsque les cellules sont bien différenciées, c'est-à-dire qu'elles présentent une morphologie et des caractéristiques proches de celles des cellules normales (phénotype épithélial et peu de prolifération). Par contre, les cellules tumorales peu différenciées sont de très mauvais pronostic. En effet, elles ont perdu toutes leurs caractéristiques d'origine et prolifèrent de façon rapide et anormale.

| Architecture tumorale : proportion de canaux ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale) | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| >75 % : Tumeur bien différenciée | 1 |
| 10-75 % : Tumeur moyennement différenciée | 2 |
| <10 % : Tumeur peu différenciée | 3 |
| Atypies = Forme et taille du noyau (apprécié sur la population tumorale prédominante) | |
| Noyaux petits, réguliers, uniformes | 1 |
| Pléomorphisme modéré | 2 |
| Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents | 3 |
| Activité mitotique : compter 10 champs au grossissement x400, valeurs définies pour un champ de 0,48mm de diamètre | |
| 0 à 6 mitoses | 1 |
| 7 à 12 mitoses | 2 |
| >12 mitoses | 3 |
| TOTAL | |
| Grade I : Tumeurs bien différenciées, de bon pronostic | 3, 4, 5 |
| Grade II : Tumeurs moyennement différenciées, pronostic moyen | 6, 7 |
| Grade III : Tumeurs peu différenciées, mauvais pronostic | 8, 9 |

Tableau 3 : Grade SBR modifié par Elston et Ellis
D'après l'Institut National du Cancer, INCa : <http://www.e-cancer.fr>

Après examen microscopique de la tumeur, le médecin anatomopathologiste évalue trois paramètres morphologiques qui sont (i) l'architecture tumorale, (ii) les atypies, c'est-à-dire la forme et la taille du noyau et (iii) le nombre de cellules qui se divisent (c'est à dire l'activité mitotique). Chacun de ces 3 critères est évalué et une note allant de 1 à 3 lui est attribuée. La somme des notes obtenues pour chacun des trois critères permet d'obtenir un score global de I à III correspondant au grade histopronostique selon la classification SBR (Scarff, Bloom et

Richardson). Actuellement, il est recommandé d'utiliser la classification SBR modifiée par Elston et Ellis, système SBR(EE), de valeur pronostic équivalente, et de reproductibilité supérieure (**Tableau 3**). Il faut noter que le grade s'applique seulement aux carcinomes infiltrants.

Le grade de la tumeur est un marqueur pronostic. En effet, les tumeurs de haut grade sont associées à un mauvais pronostic. De plus, le grade de la tumeur peut être considéré comme un marqueur prédictif de la réponse à l'hormonothérapie ainsi qu'à la chimiothérapie. Les tumeurs différenciées répondent mieux à l'hormonothérapie tandis que les moins différenciées répondent mieux à la chimiothérapie.

3. Critères moléculaires

L'amélioration des méthodes d'imagerie et la mise en place de programmes de dépistages permet de diagnostiquer le cancer du sein à des stades plus précoces. Cependant, ceci peut conduire au « surtraitement » de patientes qui n'en tireront qu'un bénéfice minime et souffriront d'effets secondaires toxiques. D'un autre côté, des traitements inadaptés doivent aussi être évités. Il est donc nécessaire de définir les caractéristiques moléculaires spécifiques aux tumeurs qui permettront d'optimiser les traitements. Pour cela, les cliniciens utilisent des biomarqueurs qui ont une valeur pronostic et/ou prédictive de la survie à la maladie.

Ces marqueurs sont extrêmement importants dans la décision thérapeutique. On parle de facteur pronostic lorsqu'un marqueur permet de prédire objectivement la survie clinique des patients, indépendamment des traitements, tandis qu'un facteur prédictif permet de prédire la réponse d'un patient à un traitement, en prenant en compte la sensibilité et la résistance de cette tumeur au traitement.

En plus des facteurs cliniques évoqués précédemment (critères anatomopathologiques), lors du diagnostic d'un cancer du sein invasif, les cliniciens analysent le statut de la tumeur pour des marqueurs moléculaires bien décrits ; le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur HER-2 et plus récemment le marqueur de prolifération Ki67. Leur présence ou leur absence impacte la survie des patientes et conditionne la prise en charge thérapeutique.

a- Récepteurs hormonaux

Le rôle des hormones sexuelles dans les cancers du sein a été supposé dès le XIX^{ème} siècle par sir Beatson (Beatson et al., 1896). Ce n'est qu'en 1966 que le récepteur aux œstrogènes a été identifié (Toft et al., 1966), permettant ensuite la découverte et l'utilisation de molécules anti-œstrogéniques dans le traitement des cancers du sein.

i. Récepteur aux œstrogènes (ER α)

Contrairement au tissu mammaire normal dans lequel moins de 10% des cellules épithéliales exprime ER α (Clarke et al., 1997), près de 70% des tumeurs mammaires diagnostiquées sont ER α positives. En France, une tumeur est considérée ER+ à partir du moment où plus de 10% des cellules cancéreuses expriment le récepteur aux œstrogènes en immunohistochimie. Les tumeurs ER+ dépendent des œstrogènes pour leur croissance, on parle donc de cancer du sein hormono-dépendant. Ainsi le récepteur aux œstrogènes est la cible majeure des thérapies endocriniennes. Il est sans aucun doute le biomarqueur le plus important dans le cancer du sein puisqu'il est à la fois un marqueur pronostic et prédictif de réponse à l'hormonothérapie et une cible thérapeutique.

ii. Récepteur à la progestérone (PR)

Bien qu'il n'existe aucun anti-progestatif utilisé en thérapie, l'analyse de l'expression du récepteur à la progestérone reste un marqueur pronostic. En effet, L'expression du récepteur à la progestérone est très fortement dépendante de la présence de ER α . PR est considéré comme un marqueur de fonctionnalité de ER α car son expression est induite par la fixation des œstrogènes sur leurs récepteurs.

On peut noter qu'il existe deux isoformes de PR, PR-A et PR-B, qui possèdent tous deux différentes activités. Dans certains cancers, une dérégulation du rapport PR-A/PR-B a été retrouvée. PR-B est principalement retrouvé dans les cancers de bas grades tandis que PR-A est majoritairement présent dans les cancers de hauts grades. De ce fait, le ratio PR-A/PR-B conditionnerait la réponse aux thérapies endocriniennes pour un sous-groupe de patientes ER+/PR+ (Hopp et al., 2004). Cependant, cela n'est pas utilisé en pratique en clinique car ces marqueurs ne sont pas évalués.

b- Les récepteurs HER

La croissance et la différenciation des cellules mammaires normales et cancéreuses sont régulées en partie par une famille de récepteurs aux facteurs de croissance épidermique humain (HER-1, 2, 3 et 4) qui sont des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase. La fixation de leur ligand induit la formation d'homo ou d'hétérodimères, conduisant à leur activation par autophosphorylation de leurs résidus tyrosine (**Figure 5**). Ces résidus phosphorylés servent de sites de fixation pour une variété de molécules de signalisation induisant entre autre prolifération, migration, invasion ou adhésion (Holbro et al, 2003). HER-2 est le seul membre de la famille des HER pour lequel aucun ligand n'est connu. Sa principale fonction biologique résulte de son hétérodimérisation avec HER-1,3 ou 4 (Olayioye et al., 2000).

En 1987, les études de Slamon ont identifié une amplification du gène *HER-2* dans certains cancers du sein (Slamon et al., 1987). Cette amplification conduit à une surexpression de la protéine HER-2. On retrouve d'ailleurs une très forte corrélation entre l'amplification de HER-2 et la surexpression de la protéine (Pegram et al., 2000). Cette altération est retrouvée dans près

de 15% des cancers du sein et est associée à un sous-type de tumeurs agressives présentant une forte diminution de la survie (Slamon et al., 1989). Le statut HER-2 est évalué sur les tumeurs en recherchant la surexpression de la protéine en immunohistochimie, et/ou l'amplification du gène par la technique de FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) (Wolff et al., 2007). L'amplification du gène a lieu sur la région 17q12 (Bertucci et al., 2004). Dans une cellule normale, on estime à 20 000 le nombre de molécules HER-2 à la surface cellulaire alors que dans le cancer du sein, sa surexpression conduit à l'expression de plus d'un million de molécules. Cette forte concentration de HER-2 entraîne sa dimérisation spontanée et une activation accrue des cascades de signalisation *en aval*. Ces tumeurs prolifèrent donc très rapidement et sont de mauvais pronostic si la cible n'est pas bloquée par un traitement adapté.

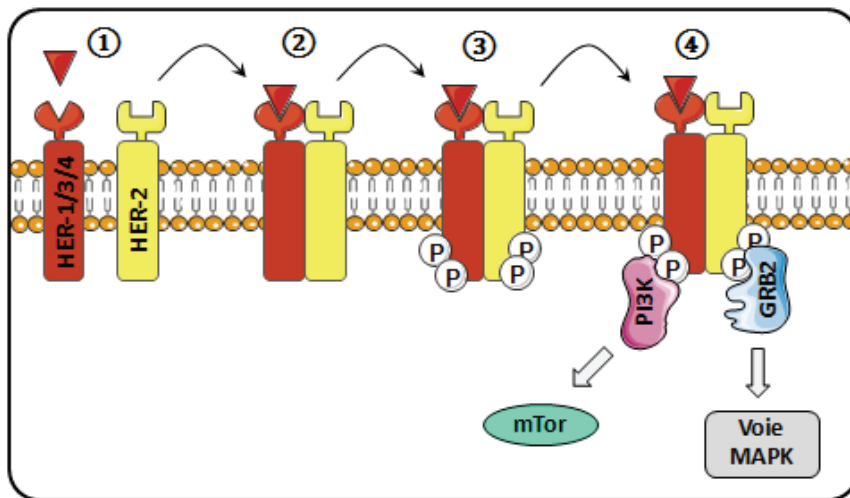


Figure 5 : La voie de signalisation de HER-2

Après reconnaissance du ligand (1), HER-2 s'hétérodimérise avec HER-1, 3 ou 4 (2). Le récepteur s'autophosphoryle (3), ce qui permet l'association de partenaires protéiques et l'activation de plusieurs voies de signalisation (4).

c- Ki67

Le marqueur de prolifération Ki67 a été pour la première fois identifié par Gerdes en 1983 (Gerdes et al., 1983) en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène nucléaire. Ki67 est une protéine nucléaire, non-histonique et doit son nom aux chercheurs qui l'ont identifié ; Ki pour l'Université de Kiel en Allemagne et 67 se réfère au nombre de clones obtenus en plaque 96 puits. La protéine Ki67 est universellement exprimée dans les cellules en prolifération et absente dans les cellules quiescentes, faisant d'elle un marqueur de prolifération. Peu de choses sont connues sur la fonction exacte de Ki67 dans la division cellulaire. La protéine est exprimée durant la phase G1, S et G2 avec un pic durant la mitose (Lopez et al., 1991). Le niveau de Ki67 est déterminé comme un pourcentage de noyaux de cellules tumorales positifs. Des études récentes montrent que l'expression de Ki67 est un marqueur pronostic. Pour des tumeurs ER+, une faible expression de Ki67 dans la tumeur primaire est associée à un plus grand bénéfice clinique apporté par un traitement endocrinien (Delpech et al., 2012; Reyat et al.,

2013). Ce marqueur bien qu'intéressant reste difficile à utiliser car la lecture du marquage en immunohistochimie n'est pas standardisé et que le seuil de positivité n'est pas clairement défini.

4. Analyse du transcriptome

Les tumeurs du sein sont très différentes, tant dans leur histoire que dans la réponse aux traitements. La diversité biologique des cellules humaines et tumorales est majoritairement due à des variations du programme transcriptionnel. Dans chaque cellule, la transduction du signal induit des informations tant au niveau de l'identité cellulaire que de l'environnement tumoral. Il a été proposé que la diversité phénotypique des tumeurs du sein pourrait être due à une grande diversité des gènes exprimés.

Jusqu'à la fin des années 1990, seules les données histologiques et cliniques permettaient de classer les différents types de cancer du sein. Plus récemment, l'utilisation de techniques d'analyses transcriptionnelles et génomiques à haut débit, telles que les puces à ADN et CGH array (Array Comparative Genomic Hybridization), ont fait apparaître clairement l'hétérogénéité de la maladie. Ces techniques ont permis de définir des sous-types de cancers du sein sur la base de l'expression transcriptionnelle d'un demi-millier de gènes ainsi qu'un répertoire d'altérations génétiques de plus en plus précis (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001) :

- Le sous-type luminal A exprime ER α et regroupe des tumeurs de bas grade (SBRI ou II), d'évolution plutôt favorable.
- Le sous-type luminal B exprime aussi ER α , mais regroupe des tumeurs moins différenciées et plus proliférantes (SBRII ou III). Certaines études les divisent en deux sous-classes : luminal B et C. Ce sous-type peut être identifié par l'expression de marqueurs du mésenchyme (vimentine).
- Le sous-type basal n'exprime pas les récepteurs hormonaux (ER α -, PR-), et ne surexprime pas HER-2. Ces tumeurs sont de haut grade et de mauvais pronostic. On assimile très souvent ces tumeurs aux cancers du sein triple négatif (ER α -, PR-, HER-2-). Très proliférantes, ces tumeurs expriment les gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire (cyclines, CDK...) et présentent fréquemment des mutations de p53. De plus ce sous-type exprime des marqueurs de cellules épithéliales basales que sont les cytokératines (CK14 et CK5/6).
- Le sous-type HER-2+ se caractérise par une surexpression de HER-2 et des gènes de l'unité d'amplification 17q12 autour de HER-2. Par définition, ces tumeurs n'expriment pas les récepteurs hormonaux.
- Le sous-type normal reste assez mal connu. Les tumeurs n'expriment pas les gènes du tissu épithélial mais ceux du tissu adipeux. De ce fait, certains parlent d'une contamination des échantillons tumoraux par du tissu adipeux mammaire (cellularité tumorale trop faible).

Les cancers basaux et luminaux sont extrêmement différents. Il existe environ 5 000 gènes différentiellement exprimés entre les sous-types luminal A et basal. Les sous-types luminaux,

HER-2 et basaux sont les mieux caractérisés (Gruver et al., 2011). Ce classement moléculaire a permis de montrer que la diversité phénotypique des tumeurs du sein est corrélée aux profils d'expression de gènes contribuant à des fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, le remodelage de la matrice extracellulaire (Sørli et al., 2001).

Ce classement établi à partir de données issues de trois banques de données de cancer du sein, tombées dans le domaine public, ne permet d'identifier sans ambiguïté que les sous-types basaux et HER-2, les autres sous-types étant associés à de fort taux d'erreur (Mackay et al., 2011).

Plus récemment, trois sous-types de tumeurs ont été identifiés :

- Le sous-type apocrine (mApo : molecular apocrine) a été identifié par une analyse par puces affimatrix de 537 tumeurs primaires (Guedj et al., 2012). Ce groupe de tumeurs est caractérisé par l'expression du récepteur aux androgènes (Farmer et al., 2005). Ce groupe de tumeurs mApo n'exprime pas les récepteurs hormonaux et est caractérisé par l'expression du récepteur aux androgènes (Farmer et al., 2005).
- Le sous-type « claudin low » fait parti des tumeurs basales mais se caractérise par une expression importante des marqueurs mésenchymateux, traduisant une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) élevée. L'EMT est un processus clé de la progression tumorale, lors duquel les cellules cancéreuses ont une capacité migratoire et invasive plus importante (Perou et al., 2010).
- Le sous-type « interferon rich » fait parti des tumeurs basales. Ce sous-type se caractérise par une forte expression des gènes régulés par l'interféron (Hu et al., 2006) et une infiltration lymphocytaire (Teschendorff et al., 2007).

Le manque de robustesse de cette classification moléculaire basée sur les puces à ADN la rend pour le moment inutilisable en clinique. L'identification de nouveaux biomarqueurs pronostics est donc toujours d'actualité et constitue un domaine actif de la recherche.

IV- Origine du cancer du sein

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales menées à travers le monde permettent d'affirmer que la susceptibilité génétique, l'exposition à des facteurs environnementaux et à des facteurs liés au style de vie jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie (Nkondjock et al., 2005) (**Tableau 4**). Cependant ils ne sont ni nécessaires, ni suffisants pour provoquer l'apparition de la maladie. La notion de risque de développer un cancer du sein est relative. Elle signifie que la probabilité de développer un cancer du sein est un peu plus élevée que la moyenne. 5 à 10% des cancers ont une origine génétique héréditaire tandis qu'environ 90% des cas sont dits sporadiques, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas héréditaires et leur origine environnementale est mal comprise car multifactorielle.

1. Facteurs génétiques

L'histoire familiale est associée, de manière générale, à un risque accru de cancer du sein. Le risque augmente chez les femmes plus jeunes lorsque la maladie s'est développée chez une proche parente avant l'âge de 50 ans (Pharoah et al., 1997).

La recherche a permis d'identifier un certain nombre de mutations génétiques favorisant la survenue de cancers du sein. Les gènes BRCA1 (BREast CANcer 1) et BRCA2 (BREast CANcer 2) sont les mutations les plus fréquentes. BRCA1 et 2 participent à la réparation des lésions de l'ADN. Etre porteur de la mutation sur l'un des gènes ne se traduit pas systématiquement par l'apparition d'un cancer, mais augmente le risque d'en développer un. C'est ce que l'on appelle la prédisposition génétique. Il est estimé que le risque associé aux mutations de ces deux gènes dépasse 87% pour les femmes et 6% pour les hommes, lorsque le sujet porteur de ces gènes atteint l'âge de 70 ans (Ford et al., 1998; Wolpert et al., 2000).

D'autres syndromes rares de prédispositions génétiques font augmenter le risque de cancer du sein. Il s'agit en majorité de mutations des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ; *TP53*, *ATM*, *PTEN*, *STK11* (aussi appelé LKB1).

2. Facteurs environnementaux et sanitaires

a- Radiations ionisantes

Le sein est un organe sensible aux effets des radiations (Key et al., 2001). L'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes, avant 40 ans, est associée à un risque de cancer du sein multiplié par trois, pour une exposition évaluée à 1 Gy. Le risque augmente du fait que les radiations endommagent l'ADN et ses constituants.

b- Obésité, densité mammographique et taille

L'obésité augmente d'environ 50% le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées, probablement dû au fait de l'augmentation des concentrations sériques d'œstrogènes libres (Key et al., 2001). Le tissu adipeux est également un site de stockage et de métabolisme des stéroïdes sexuels. Après la ménopause, l'aromatization des androgènes dans le tissu adipeux est l'une des sources majeures d'œstrogènes circulants, étant donné que les ovaires ne sont plus fonctionnels.

On estime que 30% des cancers du sein sont associés à une densité mammaire à la mammographie supérieure de 50% par rapport à la moyenne, du fait que le sein est riche en

tissu glandulaire (Boyd et al., 1998). Il faut noter que cette augmentation du risque est indépendante de l'effet des autres facteurs.

Le risque de cancer du sein augmenterait chez les patientes présentant une grande taille à l'âge adulte. La nutrition pendant l'enfance et l'adolescence pourrait en partie expliquer cela, associée à un mécanisme hormonal. Les hormones et facteurs de croissance, déterminants de la taille, affecteraient la fermeture de l'épiphyse et contribueraient à la promotion de la cancérogenèse mammaire durant la puberté (Glade et al., 1999).

c- Activité physique

Plusieurs études montrent qu'une activité physique modérée, c'est-à-dire 30 à 60 minutes au moins 4 fois par semaine diminue le risque de cancer du sein d'environ 35%, en particulier chez les femmes ménopausées (Glade et al., 1999). L'activité physique serait associée à une réduction de la production d'œstrogènes et au maintien de l'équilibre énergétique (Friedenreich et al., 2001).

d- Cigarette, alcool et déterminants nutritionnels

La fumée du tabac est une source de substances carcinogènes. Pourtant les résultats des différentes études divergent. Certains investigateurs ont trouvé que les fumeuses présentent un risque réduit du fait de la diminution des œstrogènes circulants et à l'action anti-œstrogénique du tabac. Cependant, d'autres études montrent que les fumeuses ne présentent aucun sur-risque, et d'autres rapportent une augmentation du risque de développer un cancer du sein associé au tabagisme (Charafe-Jauffret et al., 2007).

L'alcool est quant à lui un facteur nutritionnel bien établi de risque de cancer du sein. Ce risque augmente d'environ 7% pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolique par jour (Hamajima et al., 2002). L'alcool provoque une augmentation du niveau des hormones dans le sérum et une production accrue du facteur de croissance IGF (Insulin-like growth factor). IGF agit comme des agents mitogènes puisqu'ils inhibent l'apoptose et interagissent avec les œstrogènes. Une production accrue d'IGF augmente le risque de cancer du sein, notamment avant la ménopause (Yu et al., 1998).

Les résultats restent discordants quant à l'association entre le risque de cancer du sein et l'alimentation (fruits, légumes, produits laitiers, viande...) (Glade et al., 1999). La restriction de l'apport énergétique avant la première grossesse réduit le risque de cancer du sein de 23 à 76%. Cela peut s'expliquer par le recul de l'âge d'apparition des premières règles et la diminution du niveau de l'hormone de croissance IGF-1R et des œstrogènes.

3. Facteurs hormonaux et liés à la reproduction

Le cancer du sein est dans une grande majorité des cas un cancer hormono-dépendant. De ce fait, l'exposition précoce (premières règles avec l'âge de 12 ans) et prolongée (ménopause tardive) à l'imprégnation hormonale qui existe durant l'activité des ovaires sont des facteurs qui augmentent le risque de cancer du sein (Glade et al., 1999). La prise de pilules œstroprogestatives avant l'âge de 20 ans pourrait aussi être impliquée.

Les femmes ayant mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25% (Layde et al., 1989). Cet effet protecteur augmente proportionnellement au nombre d'accouchements. Toutefois les mécanismes restent mal connus. L'allaitement quant à lui semble avoir un effet protecteur. Les femmes qui ont allaité pendant une durée totale d'au moins 25 mois présentent un risque réduit de 33% par rapport à celles qui n'ont jamais allaité (Layde et al, 1989; Collaborative group on hormonal factors in breast cancer., 2002). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cela. La lactation produit des changements hormonaux endogènes, en particulier une réduction du taux d'œstrogènes et une augmentation de la prolactine. Cela diminuerait l'exposition cumulative aux œstrogènes chez la femme, et réprimerait donc l'apparition et le développement du cancer du sein.

| Preuve | Augmentation du risque | Diminution du risque |
|---------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Convaincante | Age avancé | |
| | Age précoce des premières règles (<12ans) | |
| | Grande taille à l'âge adulte | |
| | Alcool (1 boisson alcoolique par jour) | |
| | Mutations génétiques | |
| | Radiations ionisantes | |
| | Densité mammographique (>50%) | |
| Probable | Ménopause tardive (>55ans) | |
| | Contraceptifs oraux | |
| | Traitement hormonal substitutif | |
| | | Multiparité |
| | | Allaitement (pendant au moins 25 mois) |
| | Maladies bénignes du sein | |
| | Obésité (après la ménopause) | |
| | Gain de poids (à partir de 18 ans) | |
| | Activité physique régulière | |
| Insuffisante | Cigarette | Cigarette |
| | | Restriction énergétique (durant l'enfance ou l'adolescence) |

Tableau 4 : Facteurs de risque de cancer du sein

D'après (Nkondjock et al., 2005).

4. Les cellules souches cancéreuses

Depuis plusieurs années, un nombre croissant d'arguments permettent de penser que le cancer du sein se développe à partir des cellules souches mammaires (ou de leurs descendants immédiats, les progéniteurs précoces) après une série d'altérations génétiques (**Figure 6**). Ces cellules, appelées cellules souches cancéreuses (CSC), sont dotées de la capacité d'autorenouvellement. L'autorenouvellement et la différenciation seraient régulés par la division asymétrique, processus typique de la cellule souche (normale ou tumorale) par lequel elle donne naissance à une cellule fille identique et une cellule qui va s'engager dans la voie de différenciation (Besançon et al., 2009). L'hétérogénéité des cancers serait liée au type de progéniteur ou de cellule souche altérée. Les cancers luminaux proviendraient de CSC ou de progéniteurs déjà engagés donnant une descendance capable de se différencier en cellules luminales de façon plus ou moins complète (correspondant respectivement aux sous-types luminaux A et B). Les cancers basaux auraient au contraire pour origine des cellules donnant une descendance capable de s'engager dans la différenciation myoépithéliale ou épithéliale.

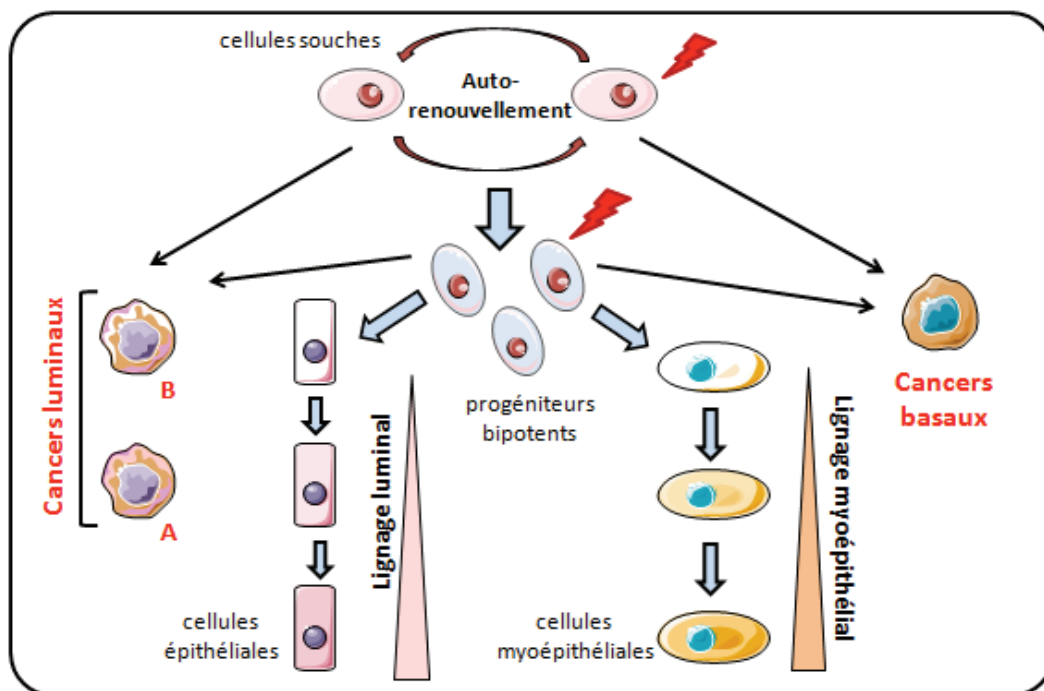


Figure 6 : Différenciation mammaire normale et tumorale

A partir de cellules souches et des progéniteurs bipotents, deux lignages se développent, aboutissant à des cellules matures différenciées, le lignage luminal et le lignage myoépithélial. Les altérations génétiques touchent les cellules souches ou les progéniteurs produisant une tumeur basale (si les capacités de différenciation sont limitées) ou luminales A ou B. Le sous-type HER-2+ et normal n'est pas représenté car on ne connaît pas la cellule d'origine.

Adapté de (Charafe-Jauffret et al., 2007).

Chapitre 2 : Le récepteur aux œstrogènes

Le récepteur aux œstrogènes appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires et plus précisément à la classe regroupant les récepteurs des hormones stéroïdiennes. L'ensemble des effets physiologiques de ER s'exerce après fixation de ses ligands appartenant à la classe des œstrogènes.

I- Les œstrogènes

Les œstrogènes sont présents aussi bien chez la femme que chez l'homme, bien qu'ils soient produits en plus grande quantité chez la femme non ménopausée. Ils agissent sur le développement des caractères sexuels secondaires et le contrôle du cycle menstruel.

1. Biosynthèse et métabolisme des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles stéroïdiennes dérivées du cholestérol à 18 atomes de carbone (C18), composées d'un squelette polycyclique fait de 4 cycles (A, B, C, D). Les trois principaux œstrogènes : (i) l'œstradiol (E2), forme majoritaire sécrétée par l'ovaire chez la femme non gestante, qui est obtenue après aromatisation de la testostérone, (ii) l'œstriol (E3) produit principalement au cours de la grossesse par le placenta et (iii) l'œstrone (E1) produit pendant la ménopause par l'aromatisation des androgènes.

Chez la femme non ménopausée, les œstrogènes sont synthétisés dans les ovaires et en moindre quantité dans le cortex surrénalien. Au cours de la grossesse, une quantité considérable est produite par le placenta (œstrone). La première étape de la synthèse des œstrogènes est la coupure de la chaîne latérale du cholestérol, puis la formation de progestérone qui conduit à la formation de précurseurs des œstrogènes, les androgènes (la testostérone et l'androsténedione). Les androgènes sont synthétisés dans les cellules thécales des ovaires puis diffusent dans les cellules de la granulosa. A ce moment, l'aromatisation du cycle A par élimination d'un méthyl, permet la conversion des androgènes en œstrogènes (**Figure 7**).

La ménopause est caractérisée par l'arrêt des fonctions ovariennes et donc à l'arrêt de la production d'œstrogènes par les ovaires. Des sources de production d'œstrogènes secondaires prennent alors le relais. Les œstrogènes proviennent alors de la transformation des androgènes, sous l'action de l'aromatase, à partir des tissus périphériques tels que les glandes surrénales, le tissu adipeux, le sein, les os, les muscles lisses et le foie.

Chez l'homme, les œstrogènes sont formés dans les testicules et dans les cellules de la corticosurrénale. Dans les testicules, la voie de biosynthèse des œstrogènes est initiée dans les cellules de Leydig et les androgènes sont aromatisés en œstrogènes dans les cellules de Sertoli. La synthèse d'œstrogènes peut aussi avoir lieu dans les tissus périphériques comme chez la femme.

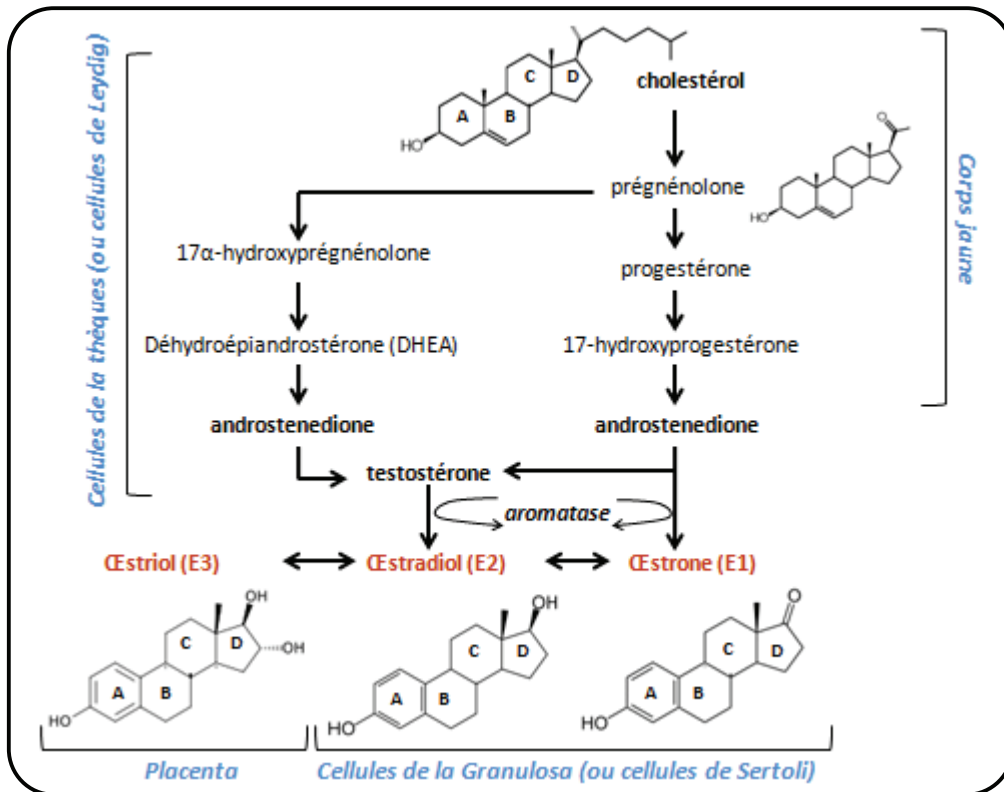


Figure 7 : La synthèse des œstrogènes

La synthèse des œstrogènes débute dans les gonades (ovaires et testicules), conduisant à la formation de progestérone puis d'androgènes (testostérone et androstènedione). Cette étape a lieu dans les ovaires, le cortex surrénalien et les testicules. L'aromatase convertit l'androstènedione en œstrone et la testostérone en œstradiol.

Après leur synthèse, les œstrogènes sont sécrétés dans le sang circulant. Seulement 2% de l'œstradiol circulant est sous forme libre, le reste est lié à des protéines de transport : 60% est lié de façon non spécifique à l'albumine et 38% est lié de façon spécifique à la globuline liant les stéroïdes sexuels (GBP : gonadal steroid-binding globulin).

2. Le cycle hormonal

La synthèse d'œstrogènes est stimulée par des hormones peptidiques anté-hypophysaires, la FSH (follicule stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone), elles-mêmes régulées par la GnRH (gonadotropin releasing hormone) qui est produite par l'hypothalamus.

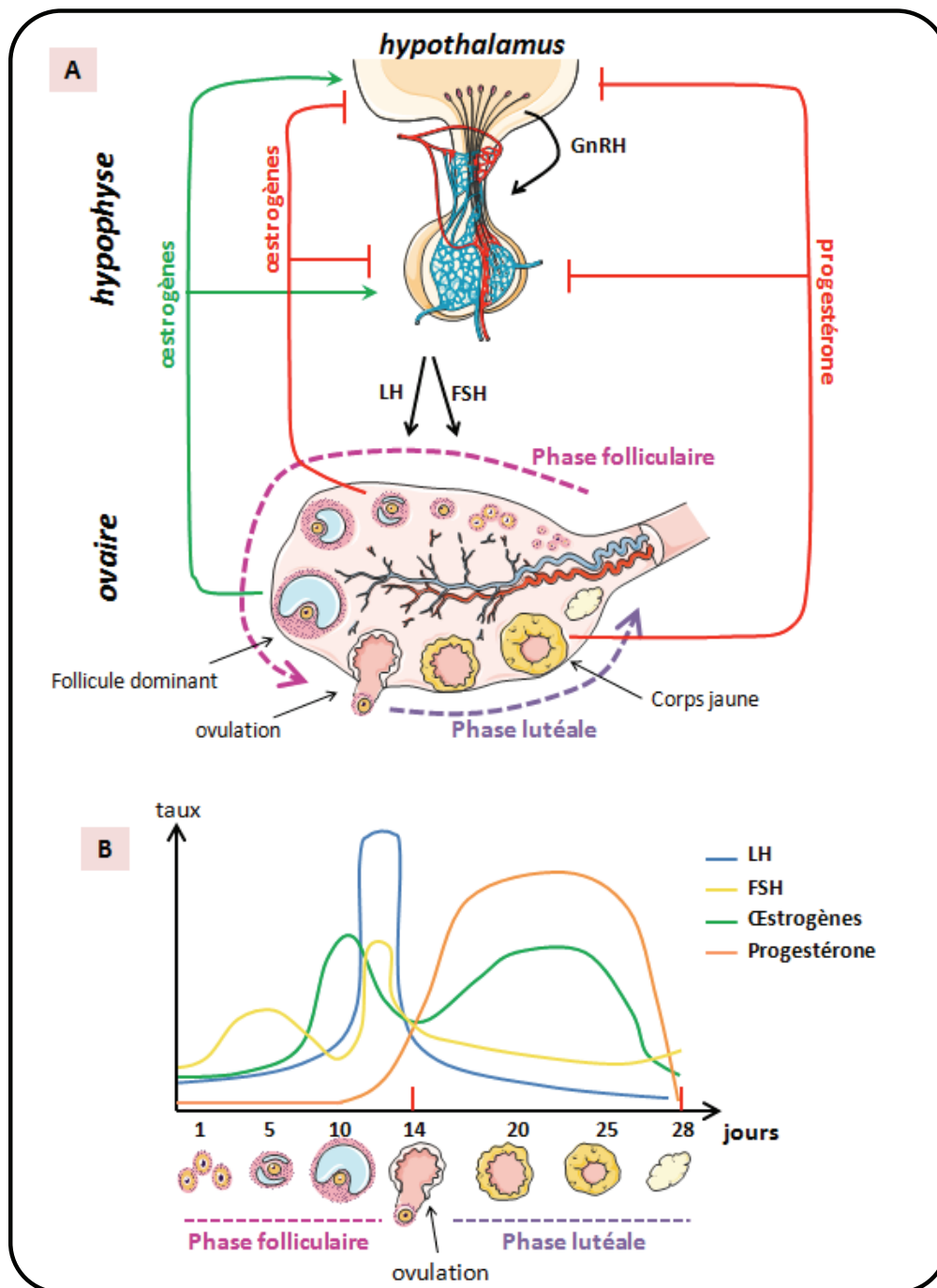


Figure 8 : Le cycle menstruel

A : Les hormones sexuelles circulantes exercent différents rétro-contrôles sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en fonction du cycle hormonal. **B** : La concentration des hormones (hypophysaires, œstrogènes et progestérones) conditionne les différentes phases du cycle : la phase folliculaire dure 14 jours et débute le premier jour des règles. Elle s'achève lors de l'ovulation. A partir de ce moment là commence la phase lutéale. Adapté de "The Merck Manual Home Health Handbook, edited by Robert S. Porter" et (Hawkins et al., 2008).

Lors de la phase folliculaire du cycle menstruel, l'hypophyse sécrète la LH et la FSH qui sont acheminées par le sang jusqu'aux ovaires, provoquant la maturation de plusieurs follicules ovariens (**Figure 8**). Les follicules ovariens sécrètent des œstrogènes, responsables d'un épaissement de la muqueuse interne de l'utérus (endomètre), afin de préparer l'utérus à

recevoir l'œuf fécondé, et d'une sécrétion abondante de glaire cervicale, destinée à faciliter l'ascension des spermatozoïdes. Lors de la première partie de la phase folliculaire, les faibles concentrations d'œstradiol exercent un rétro-contrôle négatif sur la sécrétion des hormones hypothalamiques (GnRH) et hypophysaires (LH et FSH). Tout au long de la phase folliculaire, la forte concentration d'œstradiol augmente jusqu'à atteindre un seuil à partir duquel l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, induisant ainsi un pic de concentration en LH conduisant à l'éclatement du follicule et à l'ovulation. Le follicule mature, qui s'est rompu pour libérer un ovule, dégénère et se transforme en corps jaune, qui sous l'influence de la LH sécrète de la progestérone et en plus faible quantité de l'œstradiol. La progestérone et l'œstradiol réduisent la sécrétion de LH par rétrocontrôle négatif. Si l'ovule n'est pas fécondée, le corps jaune se flétrit rapidement et dégénère ; le taux de progestérone chute alors, entraînant une desquamation de la muqueuse utérine qui s'évacue par les règles. La chute du taux de progestérone lève l'inhibition de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Un autre cycle peut alors commencer (**Figure 8**).

3. Physiologie des œstrogènes

Outre leur rôle paracrine dans les ovaires et leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, les œstrogènes agissent également sur de nombreux tissus périphériques. Ils stimulent entre autre la croissance, régulent le système cardio-vasculaire, le squelette, le foie, le système nerveux central (**Figure 9**) (pour revue (Gruber et al., 2002)).

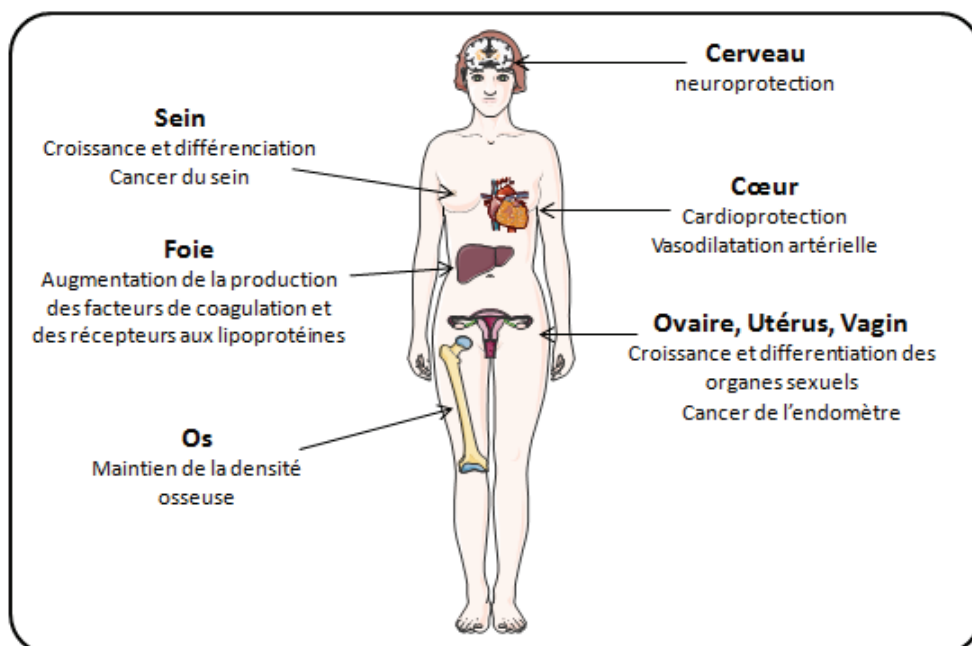


Figure 9 : Effets des œstrogènes

Adapté de (Gruber et al., 2002).

Les œstrogènes sont bien sûr essentiels pour les fonctions reproductrices, tels que la différenciation, le développement, le maintien du système reproducteur chez la femme ainsi que dans la féminisation (Carpenter et al., 2006), mais sont aussi impliqués dans le développement du cancer du sein et de l'endomètre.

Dans le foie, les œstrogènes augmentent les récepteurs aux lipoprotéines, résultant en une diminution de la concentration du cholestérol plasmatique (Paganini-Hill et al., 1996).

Ils ont aussi un rôle protecteur sur le système squelettique. Une diminution du taux d'œstrogènes, comme celle que l'on peut observer à la ménopause, est associée à une accélération de l'ostéoporose qui se traduit par une perte osseuse et une susceptibilité plus importante aux fractures.

Les œstrogènes sont des agents vasculo-protecteurs naturels. Ils entraînent entre autre une vasodilatation en augmentant la formation et la libération de l'oxyde nitrique et de prostacycline dans les cellules endothéliales. Au niveau cellulaire, les œstrogènes inhibent l'apoptose des cellules endothéliales préservant ainsi l'intégrité endothéliale (Spyridopoulos et al., 1997) et induisent les activités angiogéniques *in vitro* et dans des modèles murins (Morales et al., 1995).

Dans le tissu cérébral de rats adultes, les œstrogènes induisent le remodelage synaptique et dendritique. Dans les neurones de l'hippocampe, une aire impliquée dans la mémoire, les œstrogènes augmentent la densité des récepteurs de N-méthyl-D-aspartate et augmentent la sensibilité neuronale (Woolley et al., 1997).

II- Le récepteur aux œstrogènes

Il y a de cela 50 ans, à partir de l'observation d'une liaison spécifique de l'œstradiol dans l'utérus, Jensen et Jacobsen ont conclu à l'existence du récepteur aux œstrogènes (Jensen et al., 1962). Pendant 24 ans, le récepteur aux œstrogènes a été largement étudié dans de nombreux laboratoires, mais ce n'est qu'en 1986 qu'il a été cloné (Green et al., 1986; Greene et al., 1986). Jusqu'à 1995, il était admis qu'un seul récepteur aux œstrogènes était responsable des effets physiologiques et pharmacologiques des œstrogènes et anti-œstrogènes. Cependant, en 1995, un second récepteur aux œstrogènes, ER β a été identifié, cloné à partir d'une banque de cDNA de prostate de rat (Kuiper et al., 1996). L'ancien ER a été alors renommé ER α . Ces récepteurs sont des facteurs de transcription, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement à ER α .

1. Structure

a- Organisation génique

Le gène de ER α , nommé *ESR1* (estrogen receptor locus 1), est localisé sur le locus chromosomique 6q25.1 chez l'Homme (Menasce et al., 1993). Il s'étend sur plus de 140 kilobases et comporte 8 exons. A l'exception de l'extrémité 5' non traduite, la séquence de ce gène est fortement conservée entre les espèces. La variabilité au niveau de l'extrémité 5' et donc l'existence de multiples promoteurs permettrait une expression différentielle de ER α dans les tissus et durant le développement (pour revue (Kos et al., 2001)) (**Figure 10A**).

Le gène de ER β , quant à lui nommé *ESR2* (estrogen receptor locus 2), est localisé sur le locus chromosomique 14q23.2 chez l'Homme (Enmark et al., 1997). Il s'étend sur plus de 61 kilobases et comporte 8 exons (pour revue(Zhao et al., 2008)) (**Figure 10B**).

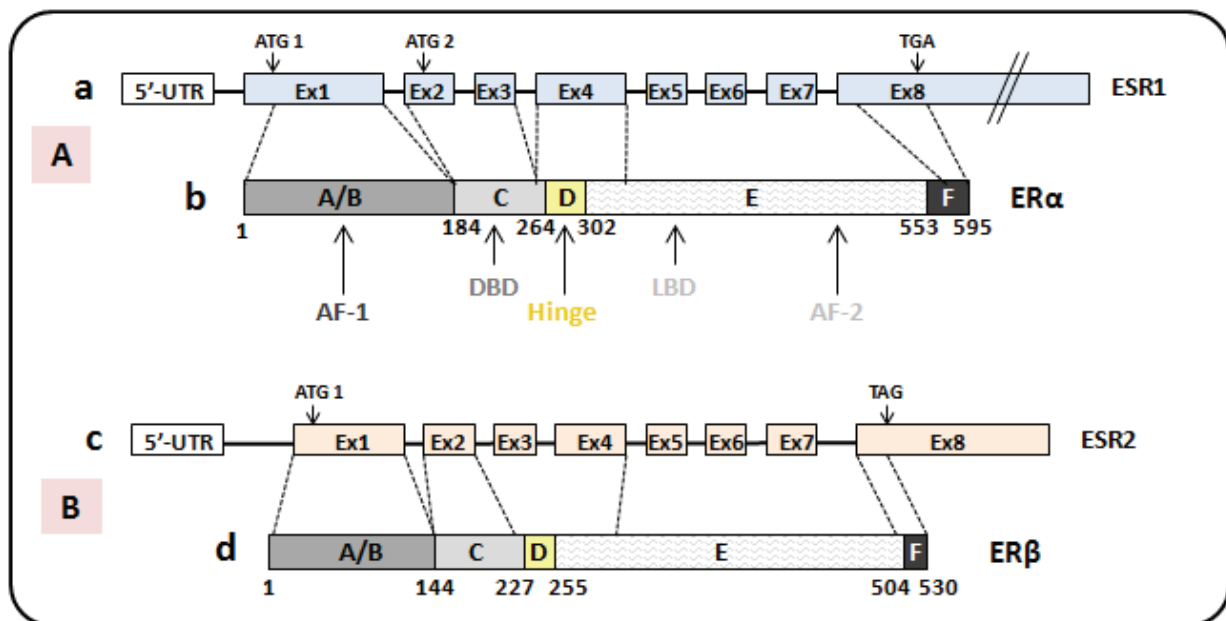


Figure 10 : Organisation génique et protéique des ERs.

Les exons sont représentés par des boîtes, tandis que les introns sont représentés par des lignes. Les lignes en pointillées entre le gène et la protéine indique les jonctions schématisées entre la structure génique et protéique.

A : ER α . **a :** Le gène *ESR1* (pour revue (Ponglikitmongkol et al., 1988)). **b :** Les 5 domaines de la protéine ER α incluant différents domaines fonctionnels. AF-1 : Domaine de transactivation hormono-indépendant, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, H : Domaine charnière, LBD : Domaine de liaison du ligand, AF-2 : Domaine de transactivation hormono-dépendant.

B : Le gène ER β . **c :** *ESR2* (pour revue(Zhao et al., 2008)). **d :** Les domaines de la protéine ER β .

b- Organisation protéique

La superfamille des récepteurs nucléaires est une très vaste famille. En dépit de cette grande diversité, tous ces récepteurs présentent de grandes homologies structurales et fonctionnelles.

Pour la plupart, ce sont des facteurs de transcription capables d'interagir avec l'ADN en réponse à la liaison de leur ligand.

Comme les autres membres de cette superfamille, ER α et ER β présentent une structure protéique composée de 6 domaines fonctionnels, désignés de A à F, depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale (Kumar et al., 1987) (**Figure 10**).

- ❖ Le domaine A/B comprend le domaine de transactivation AF-1 (activation fonction 1) qui active la transcription hormono-indépendante.
- ❖ Le domaine C (aussi appelé DBD pour DNA binding domain) comprend le domaine de liaison à l'ADN qui permet la reconnaissance de séquences d'ADN appelées éléments de réponses aux œstrogènes (ERE), situées au niveau du promoteur des gènes cibles. Le domaine C comporte deux motifs en doigts de zinc, dans lesquels quatre cystéines coordonnent de façon tétraédrique un atome de zinc. Le motif P-box situé à la base du premier doigt de zinc permet la reconnaissance des ERE alors que la D-box à la base du deuxième doigt de zinc est impliquée dans le processus de dimérisation du récepteur (**Figure 11**).

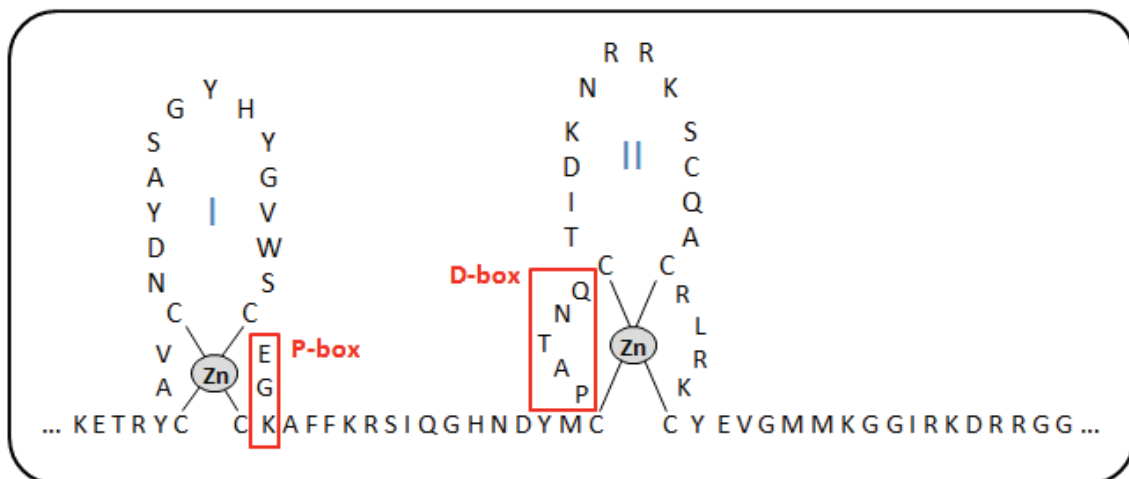


Figure 11 : Structure du domaine de liaison à l'ADN.

Le domaine de liaison à l'ADN contient 2 structures en doigts de zinc (I et II). Le motif P-box permet la liaison du récepteur à l'ADN, et la D-box permet la dimérisation du récepteur. D'après (Ponglikitmongkol et al., 1988).

- ❖ Le domaine D sert de « charnière » entre le domaine C et E, permettant la rotation du DBD et l'adoption de différentes conformations. Ce domaine contient un signal de localisation nucléaire, permettant la localisation nucléaire du récepteur.
- ❖ Le domaine E est plus complexe et permet la fixation du ligand *via* le domaine de liaison du ligand (LBD), la dimérisation du récepteur et la transactivation hormono-dépendante *via* la région AF-2 (activation fonction 2). La fonction AF-2 est une région complexe dont la

structure et la fonction sont gouvernées par la liaison du ligand. La surface d'interaction d'AF-2 est composée d'acides aminés provenant des hélices 3, 4, 5 et 12. La fixation de l'œstrogène sur son récepteur entraîne un basculement de l'hélice 12 qui referme alors la poche de liaison du ligand. Cela s'accompagne d'une compaction générale du LBD, entraînant (i) la stabilisation de la forme dimérique du récepteur sur les séquences régulatrices des promoteurs, (ii) une dissociation des corépresseurs et (iii) la création de nouvelles interactions avec des coactivateurs. Suivant le ligand reconnu par le récepteur, sa conformation sera différente et le positionnement de l'hélice 12 sera à l'origine des effets agonistes ou antagonistes des œstrogènes (Ruff et al., 2000).

- ❖ Le domaine F, situé à l'extrémité C-terminal du récepteur est encore mal connu. Néanmoins, dans le cas de ER α , il pourrait moduler l'activité transcriptionnelle de ER α et les interactions protéines-protéines, notamment avec SRC-1 (Steroid receptor coactivator-1) (Koide et al., 2007).

Les protéines ER α et ER β ont une structure protéique similaire, avec un fort degré d'homologie. La région la plus conservée est le domaine de liaison à l'ADN (DBD), conservée à 96%, ce qui permet la reconnaissance spécifique des mêmes éléments de réponse aux œstrogènes au niveau du promoteur des gènes cibles (Pace et al., 1997).

Le domaine de liaison au ligand (LBD) de ER β présente près de 53% d'homologie avec celui de ER α . De ce fait, la liaison de l'œstradiol sur ER α et ER β se fait avec des constantes d'affinité similaires ($K_d=0,05nM$). Cependant, on observe des différences au niveau de l'affinité d'autres ligands (Kuiper et al., 1998).

La partie amino-terminale de ER β est plus courte d'environ 40 acides aminés par rapport à ER α (17% d'homologie). Son activité transcriptionnelle AF-1 est donc considérablement réduite et les coactivateurs qui se lient sont différents. De ce fait, ER α et ER β possèdent des effets transcriptionnels différents (Hall et al., 1999). ER α est associé à la prolifération cellulaire alors que ER β aurait un rôle anti-prolifératif (Krege et al., 1998). Ainsi, ER β est capable d'inhiber la transcription médiée par ER α ou d'induire la prolifération cellulaire sous œstradiol selon les lignées de cancer du sein utilisées (Gougelet et al., 2007). ER β aurait un rôle suppresseur de tumeur (Lazennec et al., 2001).

Au niveau fonctionnel, les souris KO pour ER α présentent une infertilité, une atrophie importante de l'utérus, des kystes hémorragiques de l'ovaire et un développement rudimentaire des glandes mammaires. De plus, ces souris sont obèses, et le rétro-contrôle régulant la sécrétion de LH observé dans les souris sauvages est absent (Emmen et al., 2003).

2. Les isoformes de ER

En plus des transcrits classiques, de nombreux variants d'épissage provenant d'épissage ou de promoteurs alternatifs ont été caractérisés. Par défaut, nous appelons ER α 66, ER α . Parmi les variants les plus décrits de ER α , on note les variants ER α 46 et ER α 36 (**Figure 12A**).

L'isoforme ER α 46 (46kDa) est transcrit à partir d'un promoteur alternatif qui se trouve dans l'exon 2. Cela conduit à la protéine ER α 46 qui a été identifiée entre autre dans les cellules MCF7, issues d'un adénocarcinome mammaire (Trivedi et al., 1996) et dans les cellules endothéliales (Li et al., 2003a). Il a été démontré que ER α 46 réprime l'activité de ER α (Flouriot et al., 2000) et qu'il inhibe la transcription induite par l'œstradiol des gènes pS2 *via* le recrutement de corépresseurs (Penot et al., 2005).

L'isoforme ER α 36 (36kDa), dépourvu des domaines AF-1 et AF-2, a été retrouvé dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Wang et al., 2005). Cet isoforme, principalement cytoplasmique, induit les voies de signalisation non génomique des œstrogènes MAPK-dépendantes (Wang et al., 2006; Zhang et al., 2011a). Il résulte de l'épissage alternatif de ER α . ER α 36 est aussi caractérisé par une région de 27 acides aminés uniques en C-terminal.

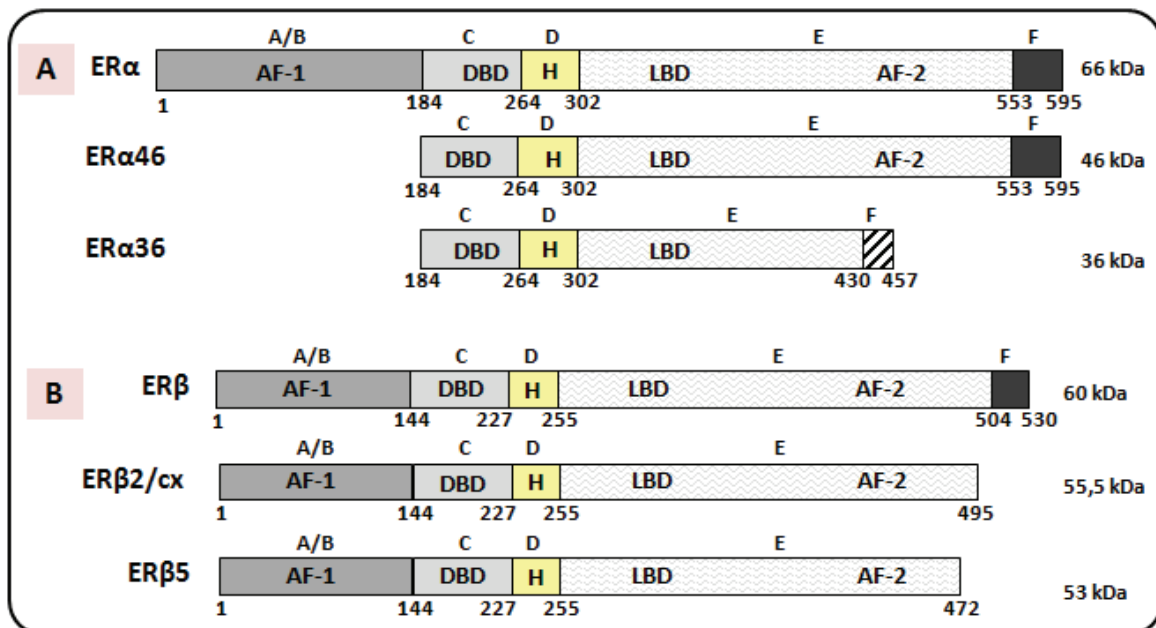


Figure 12 : Les isoformes de ER

A : ER α 36 et ER α 46 sont deux isoformes de ER α . **B** : ER β 2/cx et ER β 5 sont deux isoformes de ER β .
D'après (Le Romancer et al., 2011).

En plus de ER β 60, nommé ER β , d'autres variants d'épissage, ER β 2/cx et ER β 5, ont été identifiés dans des tumeurs du sein (Davies et al., 2004; Moore et al., 1998). Leurs rôles exacts sont peu décrits, mais leurs implications dans les phénomènes de résistance à l'hormonothérapie est suspecté (Skliris et al., 2006) (**Figure 12B**).

famille des immunophilines, pouvant être la FKBP52 (FK506 binding protein 52 aussi appelée p59) qui interagit directement avec Hsp90 même en absence de récepteur (Renoir et al., 1990; Tai et al., 1986), la FKBP51 ou la cyclophiline 40 (Cyp40) (Ratajczak et al., 1996). La fixation du ligand et l'hydrolyse de l'ATP permettent l'ouverture de la pince et la fixation de l'œstrogène sur son récepteur. (**Figure 14**).

En absence de ligand, ce complexe autour de Hsp90 permet de séquestrer, stabiliser et de rendre inactif ER α (Johnson et al., 1994). En effet, l'inhibition de Hsp90 par des agents chimiques induit l'ubiquitinylation de ER α et sa dégradation par le protéasome (Roe et al., 1999). La prise en charge des récepteurs nucléaires par le complexe de cochaperonnes leur permet d'acquérir une structure ayant une affinité maximale pour leur ligand (Picard et al., 1988).

On peut noter que la protéine ER β est elle aussi capable d'interagir avec Hsp90 en absence de ligand. Cependant, les ligands de ER affectent différemment la dégradation de ER α et ER β , suggérant que la stabilité des récepteurs serait différenciellement régulée par Hsp90 (Gougelet et al., 2005).

2. Les voies génomiques de ER α

a- La voie classique

La liaison de l'hormone sur son récepteur entraîne un changement conformationnel du récepteur, qui se dissocie du complexe de chaperonnes moléculaires, se dimérise, permettant sa translocation dans le noyau (Sabbah et al., 1996). Le dimère peut alors se fixer aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), situés en amont des gènes cibles. La séquence consensus minimale de l'ERE est une séquence palindromique de 13 paires de bases inversées et séparées par 3 nucléotides variables (x) : 5'-GGTCAXXXTGACC-3' (Walker et al., 1984). Cependant seul un petit nombre de gènes parmi tous ceux induits par les œstrogènes possèdent cette séquence consensus. Dans la plupart des cas, le dimère de récepteurs se fixe sur des séquences imparfaites (pS2, VEGF, PR, cathépsine...) ou encore des demi-palindromes (Klinge et al., 2001). En fonction du type cellulaire, des promoteurs mis en jeu, ainsi que du ligand impliqué, le récepteur peut alors exercer une activité stimulatrice ou inhibitrice vis-à-vis de l'expression des gènes cibles.

i. Activation de la transcription

La liaison d'un agoniste de ER α induit un changement de positionnement de l'hélice 12 de ER α conduisant à la formation d'une poche hydrophobe délimitée par les hélices 3, 4, 5 et 12 du LBD (Brzozowski et al., 1997). Cette interface permet l'interaction avec les motifs LxxLL (L : leucine, x : résidu variable) présents sur de nombreux coactivateurs.

Une fois fixé sur un ERE, ER α peut activer la transcription du gène *via* ses fonctions de transactivation AF-1 et AF-2 et il peut recruter des coactivateurs. Parmi ceux qui ont été identifiés, trois volumineux complexes ont été particulièrement caractérisés et jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription : (i) le complexe de coactivateurs associés aux SRC (p160 steroid receptor coactivators), (ii) le complexe SWI/SNF à l'origine du remodelage de la chromatine de façon ATP-dépendante, et (iii) le complexe Mediator (pour revue (Rosenfeld et al., 2006)) (**Figure 15**).

- (i) Parmi ces coactivateurs, on retrouve SRC-1, SRC-2 (ou GRIP1 ou TIF2) et SRC-3 (ou AIB1) qui sont membres de la famille p160. Ces coactivateurs primaires recrutent ensuite des coactivateurs transcriptionnels secondaires comme les histones acétyltransférases telles que p300/CBP (CREB binding protein), pCAF (p300/CBP associated protein), ou encore des méthyltransférases telles que PRMT1, CARM1.
- (ii) Le recrutement des complexes activateurs attire des complexes ATPase, tels que SWI/SNF, qui participent au remodelage de la chromatine.
- (iii) Cet évènement facilite ensuite le recrutement du complexe Mediator qui recrute la machinerie transcriptionnelle, contenant entre autre l'ARN polymérase II et TBP (TATA binding protein) afin d'initier la transcription.

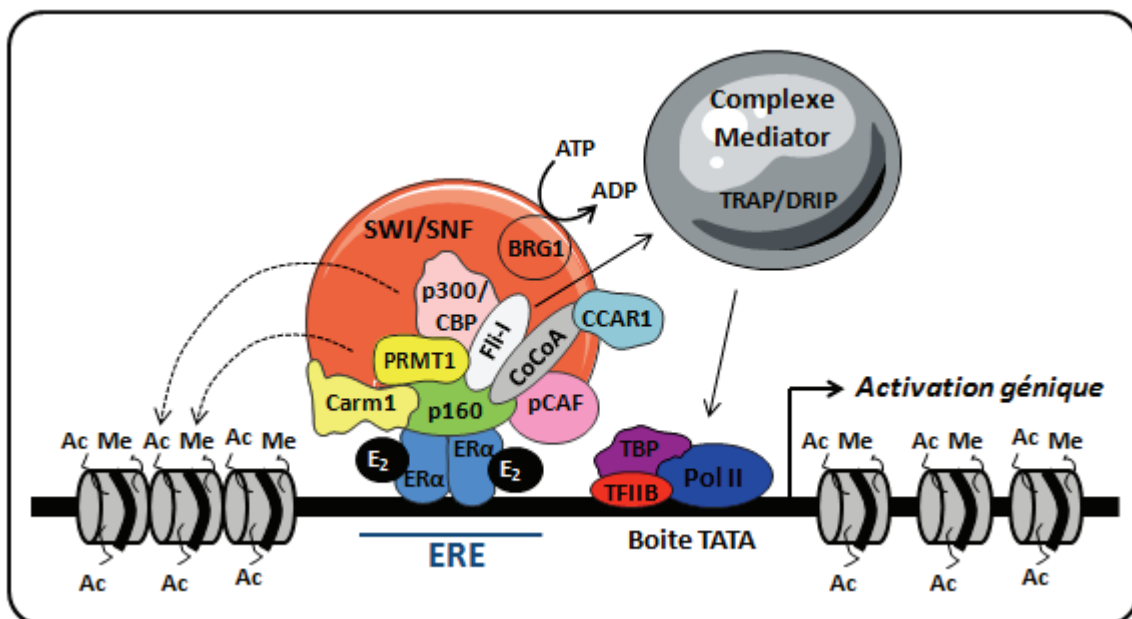


Figure 15 : Mécanismes d'action des coactivateurs de ER α

Au niveau des promoteurs œstrogéno-dépendants, en présence d'œstrogènes, ER α recrute de nombreux coactivateurs dont les coactivateurs de la famille p160, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF ou encore le complexe Mediator, le tout résultant en l'activation des gènes cibles.

La famille de coactivateurs p160/SRC.

SRC-1, SRC-2 et SRC-3 sont trois membres de cette famille et contiennent trois motifs LxxLL, qui permettent la fixation du domaine AF-2 (Leers et al., 1998). De plus, ils contiennent deux

domaines d'activation de la transcription, AD-1 et AD-2. AD-1 est impliqué dans le recrutement de CBP/p300, et AD-2 dans le recrutement de PRMT1 et CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase) qui méthylent les histones (Chen et al., 1999a). De plus, l'extrémité C-terminale de SRC-1 et SRC-3 a une extrémité lysine-acétyltransférase. Ces structures indiquent que les coactivateurs SRC recrutent des activités enzymatiques modifiant la chromatine au niveau des récepteurs nucléaires. De plus, l'extrémité N-terminale des SRCs a la capacité d'interagir avec plusieurs corégulateurs, dont Fli-1 (Flightless-1) et CoCoA (Coiled-coil coactivator). Fli-1 est essentiel pour le recrutement du complexe SWI/SNF (Jeong et al., 2009), tandis que CoCoA interagit avec CCAR1 (cell cycle and apoptosis regulator 1) qui est nécessaire pour le recrutement du complexe Mediator au niveau des gènes cibles (Kim et al., 2008).

CBP/p300.

CBP/p300 est un complexe ubiquitaire, impliqué dans une multitude de voies de signalisation. CBP/p300 contient un site de fixation pour ER α *via* un motif consensus LxxLL en région N-terminale. Son implication dans l'activation de ER α est bien décrit (Hanstein et al, 1996; Kraus et al., 1998). Cependant il n'est pas clairement établi si CBP/p300 peut se lier directement sur ER α dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire en présence d'autres coactivateurs.

Le complexe SWI/SNF.

Dans le cas de la signalisation œstrogénique, l'activité catalytique ATPase de ce complexe est assurée par BRG1 (Brahma-related gene 1) (DiRenzo et al., 2000). BRG1 est composée de différentes régions pouvant servir de modules d'interactions protéiques et interagit avec 10 à 12 protéines appelées BAFs (BRG1-associated factors). Certaines des BAFs ont la capacité de lier directement les récepteurs stéroïdiens, comme par exemple BAF57 dans le cas de ER α , entraînant ainsi le recrutement du complexe SWI/SNF sur les promoteurs des gènes cibles (García-Pedrero et al., 2006). De plus, BRG1 contient un bromodomaine reconnaissant spécifiquement les queues des histones acétylées (Singh et al., 2007).

Le complexe Mediator.

Ce large complexe coactivateur, aussi appelé TRAP/SMCC/DRIP (TRAP : thyroid hormone receptor-associated protein, SMCC : SRB- and MED-containing cofactor complex, DRIP : Vitamin D Receptor Interacting Protein), est composé de plus de 26 sous-unités protéiques.

L'équipe de Evans a mis en évidence que l'acétylation, réalisée par CBP/p300 neutralise les charges positives de deux lysines adjacentes au motif LxxLL, ce qui dissocie le complexe coactivateurs des promoteurs cibles de ER α (Chen et al., 1999c). Cela permettrait ensuite au complexe Mediator d'entrer en jeu. De plus, l'équipe de M. Stallcup a montré que CCAR1 peut s'associer avec certains composants du complexe Mediator aussi bien qu'avec CoCoA (partenaire de SRC). Cela suggère que CCAR1 serait une plateforme coordinatrice des complexes coactivateurs SRC et Mediator et serait essentielle pour le recrutement du complexe Mediator sur les gènes cibles de ER α .

En résumé, les activités enzymatiques apportées par le recrutement de tous ces complexes protéiques modifient les histones et induisent l'ouverture de la chromatine facilitant l'expression génique. Les modifications des histones associées à l'activation transcriptionnelle sont la méthylation de H3K4, l'acétylation de H3K9 et de H4K20, ainsi que la méthylation des H3K17, H3K26 et celle de H4R3.

ii. Répression de la transcription

Certaines études ont montré que toutes les protéines liant le domaine AF-2 de ER α n'agissent pas seulement comme des coactivateurs. Deux protéines, RIP140 (Recepteur-interacting protein of 140 kDa) et SHP (short heterodimer partner), présentent des fonctions corépressives. Elles seraient capables d'agir comme antagonistes des coactivateurs SRC en interagissant avec AF-2. C'est une catégorie de corepresseurs distincte des corépresseurs conventionnels.

RIP140.

RIP140 a été identifiée en 1995 par l'équipe de M. Parker comme corépresseur de ER α (Cavaillès et al., 1995). L'analyse de la structure protéique de RIP140 a permis de mieux comprendre le « côté atypique » de ce cofacteur. La séquence de RIP140 contient 9 motifs LxxLL. Le nombre particulièrement élevé de ce motif lui offre une grande diversité de recrutement sur les récepteurs nucléaires puisqu'il interagit avec de nombreux récepteurs stéroïdiens. De plus, la mise en évidence d'une activité intrinsèque de RIP140 a permis d'identifier différents domaines transrépresseurs recrutant des médiateurs pouvant participer à la régulation négative de la transcription. La région N-terminale de RIP140 est capable de recruter des protéines HDACs de type I (HDAC1, 2, 3) et II (HDAC5) (Wei et al., 2000). Deux motifs situés dans la région centrale de la protéine lui permettent de recruter les protéines CtBP1 et CtBP2 (Carboxyl-terminale Binding Protein 1 et 2), qui sont des médiateurs de régulations transcriptionnelles négatives (Vo et al., 2001) (**Figure 16A**).

SHP.

SHP est un récepteur nucléaire orphelin composé de seulement un domaine de liaison à un ligand inconnu. Il est capable d'interagir avec ER α *via* un motif LxxLL. Il a été montré que SHP réprime l'activité transcriptionnelle de ER α directement en interagissant avec son domaine AF-2 (Johansson et al., 1999; Johansson et al., 2000).

A l'inverse des œstrogènes, la liaison d'un antagoniste des œstrogènes sur le récepteur (tel que le tamoxifène) induit une conformation différente du dimère de récepteur. ER α se fixe alors sur ses ERE mais induit l'association avec des corépresseurs tels que N-CoR (nuclear receptor corepressor), SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors), qui fonctionnent comme des adaptateurs pour le recrutement des HDACs, induisant ainsi la fermeture de la chromatine et donc l'arrêt de la transcription génique (Shang et al., 2000; Smith et al., 1997) (**Figure 16B**).

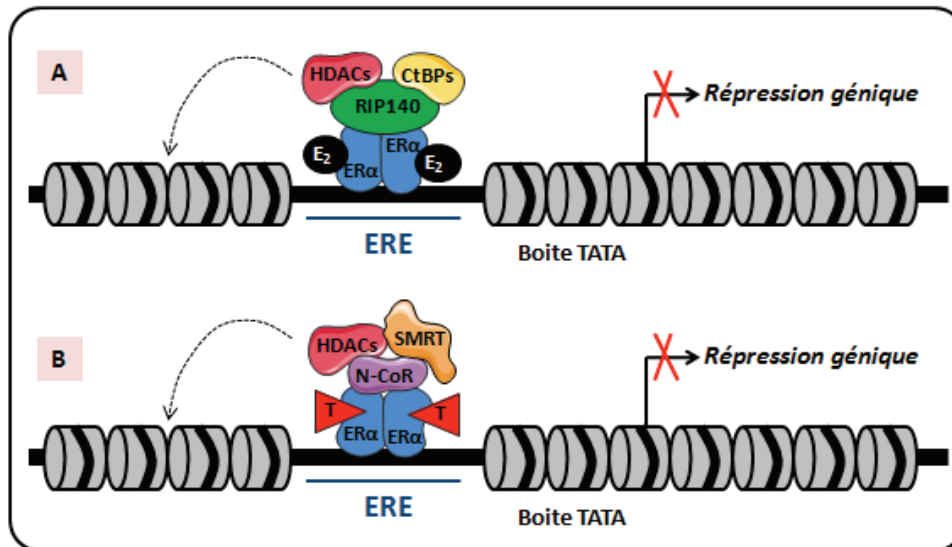


Figure 16 : Mécanismes d'action des coactivateurs de ER α

ER α peut recruter des corépresseurs et induire l'arrêt de la transcription après (A) stimulation aux œstrogènes ou (B) traitement au tamoxifène. E₂ : œstrogènes, T : Tamoxifène.

La plupart des corégulateurs connus ont été découverts pour leur rôle dans l'activation de la transcription ou sa répression, et sont donc désignés comme coactivateurs ou corépresseurs. Cependant, des études mécanistiques ont permis de montrer que certains de ces coactivateurs ou corépresseurs sont associés à des fonctions activatrices et répressives de la transcription, suivant les circonstances. De ce fait, le terme de corégulateurs est probablement plus adapté pour caractériser toutes ces protéines. Par exemple, le coactivateur SRC-2 fonctionne comme un coactivateur pour les récepteurs nucléaires sur les gènes cibles qu'ils activent, mais SRC-2 peut aussi être considéré comme un corépresseur pour ces mêmes protéines sur les gènes cibles qu'ils répriment (Rogatsky et al., 2002). De même, N-CoR et SMRT, connus pour être des corépresseurs transcriptionnels, peuvent parfois fonctionner comme des coactivateurs (Tagami et al., 1997). Il existe d'autres exemples de corégulateurs qui fonctionnent soit comme activateurs, soit comme répresseurs, tels que Zac1, NSD1, ou encore G9a (Huang et al., 2000; Huang et al., 1998; Purcell et al., 2011). De même, le corépresseur RIP140 qui peut aussi fonctionner comme un coactivateur (Fritah et al., 2010). Les mécanismes permettant à un même corégulateur de changer de fonction restent encore à comprendre.

b- La voie non classique

Le récepteur aux œstrogènes est capable d'induire la transcription de gènes dépourvus de séquences ERE, par liaison indirecte à l'ADN, *via* l'interaction avec d'autres facteurs de transcription liant eux-mêmes directement les éléments de reconnaissance sur l'ADN. Dans cette voie de signalisation, ER module l'activité de facteurs de transcription tels que AP-1 (activator protein-1), Sp-1 (specificity protein-1) ou NF- κ B (nuclear factor- κ B) (**Figure 17**). Dans ces cas là, ER α peut être assimilé à un corégulateur d'autres facteurs de transcription.

i. AP-1

AP-1 est un complexe de facteur de transcription contenant les proto-oncogènes JUN et FOS. Ce complexe interagit avec les sites AP-1 sur les promoteurs de gènes activant la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. ER α , activé par les œstrogènes, serait recruté de façon indirecte sur les sites AP-1 par l'intermédiaire de coactivateurs de la famille p160 (Webb et al., 1999). Les fonctions de transactivation AF-1 et AF-2 seraient essentielles à cette voie de signalisation.

En 2005, DeNardo et ses collègues ont identifiés 20 nouveaux gènes induits par les œstrogènes qui sont AP-1 dépendants (DeNardo et al., 2005). L'induction de la voie AP-1 par ER α après stimulation aux œstrogènes conduit à la transcription de gènes impliqués principalement dans la prolifération et la motilité cellulaire dont c-fos, la cycline D1, la collagénase, la fibronectine 1, la tropomyosine ou encore l'IGF1 (DeNardo et al., 2005, 2007) (**Figure 17A**).

Dans différents types cellulaires, les œstrogènes mais aussi les anti-œstrogènes tels que le tamoxifène et le fulvestrant, activent la transcription AP-1 dépendante. L'effet agoniste du tamoxifène sur ER α dans certains tissus pourrait s'expliquer par l'activation de cette voie de signalisation AP-1 dépendante (Webb et al., 1999).

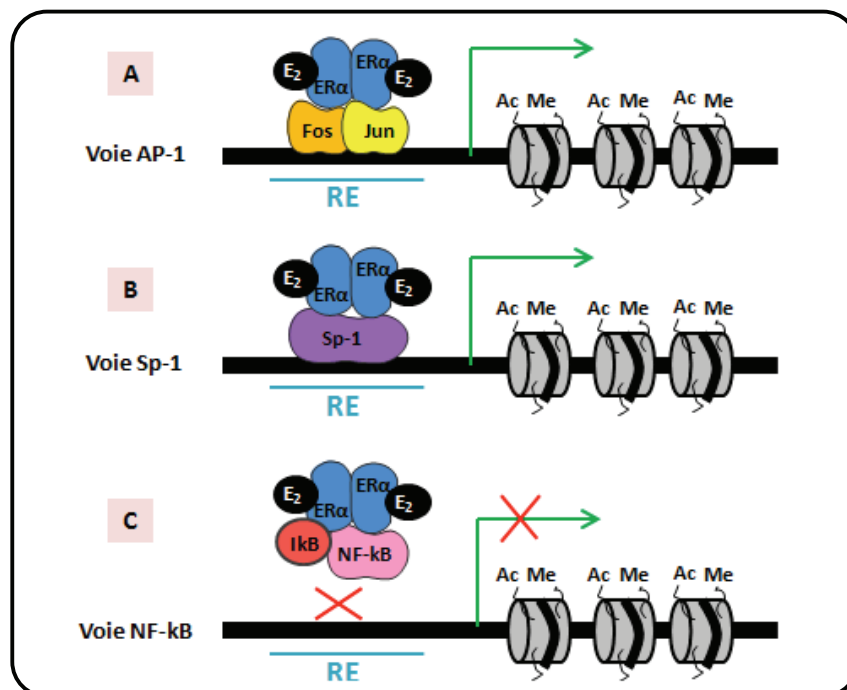


Figure 17 : La voie génomique non classique des œstrogènes

ER peut se lier à l'ADN sur des éléments de réponses (RE) via d'autres facteurs de transcription, tels que (A) AP-1, (B) Sp-1 ou (C) NF-kB.

ii. Sp-1

La protéine Sp-1 a été le premier facteur de transcription identifié au début des années 1980 (Dyan et al., 1983). Ce facteur contient un motif en doigt de zinc, par lequel il se lie directement à l'ADN sur des séquences riches en GC et augmente la transcription génique.

Une analyse du promoteur du gène de la cathepsine D, un gène œstrogéno-régulé, par des expériences de mutations du site riche en GC et des expériences de retard sur gel ont permis d'identifier un complexe ER α /Sp-1/ADN (Porter et al., 1997). Cela démontre clairement qu'il existe un autre mécanisme ERE-indépendant. De la même façon que pour AP-1, le domaine AF-1 de ER α est essentiel à la stimulation aux œstrogènes Sp-1 dépendant (Saville et al., 2000). La voie Sp-1 est impliquée dans la prolifération cellulaire induite par les œstrogènes *via* la production de protéines comme c-myc, cycline D1 ou Bcl-2 (O'Lone et al., 2004) (**Figure 17B**).

iii. NF-kB

La famille des facteurs de transcription NF-kB régule de nombreux gènes qui sont essentiels pour le développement, le maintien et le fonctionnement du système immunitaire inné et adaptatif. NF-kB est généralement associé à I κ B, l'inhibiteur de NF-kB. La phosphorylation de I κ B induit son ubiquitinylation et sa dégradation protéosomique et donc l'accumulation de NF-kB actif. NF-kB peut alors se lier aux promoteurs de ses gènes cibles et recruter les coactivateurs afin de stimuler leur transcription.

ER α est décrit pour moduler le facteur de transcription NF-kB, en agissant comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle (pour revue (Kalaitzidis et al., 2005)). Par exemple, cette signalisation serait impliquée dans le maintien de l'homéostasie osseuse puisque ER α , après stimulation œstrogénique, interagirait avec NF-kB pour inhiber l'expression de l'interleukine-6, impliquée dans la résorption osseuse (Galien et al., 1997). Au niveau mécanistique, ER α bloquerait NF-kB en inhibant la dégradation de I κ B ou encore en bloquant la liaison à l'ADN de NF-kB (**Figure 17C**).

c- La voie indépendante des œstrogènes

En parallèle d'une activation hormono-dépendante, l'activité du récepteur aux œstrogènes peut être modulée par des signaux extracellulaires, en absence d'œstrogènes. Les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor) et IGF-1 sont ainsi capables d'activer le récepteur par phosphorylation et d'induire l'expression de gènes cibles. Cela est possible par la présence sur ER α d'un domaine d'activation hormono-indépendant en N-terminal, AF-1, qui est sujet à plusieurs phosphorylations. Ainsi la phosphorylation de ER α module ses capacités transactivatrices (pour revues (Lannigan et al., 2003; Le Romancer et al., 2011)).

La sérine 118 est le site majeur de phosphorylation en réponse aux facteurs de croissance (Kato et al., 1995; Bunone et al., 1996). Bunone et al. ont montré que la phosphorylation de la sérine 118 active ER α en absence d'œstrogènes (Bunone et al., 1996). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que ER α phosphorylé sur la sérine 118 se localise au niveau de plusieurs promoteurs de gènes cibles, ce qui démontre clairement son rôle dans la transcription (Weitsman et al., 2006). De plus, il a été montré qu'en absence d'œstrogènes, la kinase AKT phosphoryle ER α sur la sérine 167 au niveau d'un site consensus (Campbell et al., 2001).

3. Les voies non génomiques de ER α

Parallèlement aux effets génomiques précédemment décrits, il existe des effets dits « rapides », usuellement appelés effets « non génomiques » des œstrogènes. Ces effets se réfèrent à des événements qui surviennent dans les secondes ou les minutes après administration des œstrogènes, c'est-à-dire qu'ils sont trop rapides pour être médiés par l'activation transcriptionnelle de gènes. Les voies non génomiques ont été décrites depuis de nombreuses années (Pietras et al., 1977), mais la nature du récepteur impliqué reste encore un sujet controversé.

a- La nature du récepteur

i. Le récepteur conventionnel

De nombreux travaux décrivent un pool de ER α localisé dans le cytoplasme, près de la membrane plasmique de différents types cellulaires (Chambliss et al., 2002; Clarke et al., 2000; Pappas et al., 1995). ER α a aussi été identifié près de la membrane par immunohistochimie (Norfleet et al., 1999). De plus, l'équipe de E. Levin a montré que des lignées cellulaires dérivées de souris knock out pour ER α /ER β perdent leur capacité à répondre aux œstrogènes de manière rapide *via* des cascades de kinases après stimulation par les œstrogènes (Pedram et al., 2006). Par chromatographie d'affinité et spectrométrie de masse réalisées à partir de lignées cellulaires de cancer du sein, ER α a été identifié dans le cytoplasme, comme étant le même récepteur que celui retrouvé dans le noyau.

Ces différentes observations n'expliquent pas comment le récepteur peut se localiser près de la membrane plasmique. En effet, les œstrogènes ont la capacité de diffuser à l'intérieur de la cellule, ce qui ne nécessite pas une insertion membranaire de ER. De plus, ER α ne possède ni peptide signal, ni domaine hydrophobe, ni glycosylation, mécanismes nécessaires à une insertion membranaire. Cependant, ER α , tout comme la plupart des récepteurs nucléaires, est une protéine extrêmement dynamique dans la cellule grâce en partie aux signaux de localisation nucléaire et d'export nucléaire. Cela lui permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme.

Différents travaux décrivent une localisation cytoplasmique de ER α .

(i) En 2004, une modification post-traductionnelle, la palmitoylation a été identifiée et pourrait expliquer la localisation cytoplasmique de ER α . Elle a lieu sur la cystéine 447 par une PAT (palmitoyl acyltransferase) (Acconcia et al., 2004) et consiste en l'ajout d'acides gras ou d'isoprénoïdes qui augmentent l'hydrophobicité des protéines et facilitent ainsi son association aux membranes. Une mutation de ER α sur la cystéine 447 empêche sa localisation membranaire et limite l'activation rapide induite par les œstrogènes de la voie MAPK (Acconcia et al., 2005). De plus, l'inhibition de l'activité de la PAT empêche l'activation des voies MAPK/Akt, suggérant le rôle central de la palmitoylation dans la signalisation cytoplasmique des œstrogènes. La palmitoylation de ER α permet son interaction avec la cavéoline-1 au niveau des cavéolae,

structures de rafts lipidiques, qui concentrent de nombreuses molécules de signalisation. Il a été démontré que l'association entre ER α et la cavéoline-1 est essentielle pour la localisation membranaire de ER α , puisque lorsque l'on inhibe la cavéoline-1 dans des modèles cellulaires, ER α se retrouve dans le noyau (Razandi et al., 2002). De même, la striatine, une protéine liant la cavéoline, cible ER α au niveau de la membrane plasmique (Lu et al., 2004).

(ii) En plus de la cavéoline ou la striatine (Lu et al., 2004; Razandi et al., 2003a), d'autres travaux ont démontré l'existence d'un pool endogène de ER α à la membrane favorisé par une association protéique. La protéine adaptatrice Shc (Src-homology and collagen homology) aurait cette capacité. Shc ne possède pas de domaine kinase intrinsèque et transduit le signal *via* l'association avec des récepteurs membranaires. Les œstrogènes induisent très rapidement la phosphorylation de IGF-1R. Ces résidus phosphorylés permettent le recrutement de Shc et ER α . Shc est alors à son tour phosphorylé sur son résidu tyrosine. Ces résidus modifiés favorisent la fixation de Grb2, activant la voie MAPK *en aval* (Ravichandran et al., 2001). D'ailleurs, l'inhibition de Shc avec un siRNA spécifique, diminue l'interaction entre ER α et IGF-1R d'environ 87%, suggérant que Shc est une molécule cruciale pour la formation du complexe protéique. Shc et IGF-1R sont donc des éléments clés pour la translocation membranaire de ER α et les voies non génomiques œstrogéno-dépendantes (Song et al., 2004, 2002).

(iii) La sérine 522 du domaine E de ER α serait aussi importante pour la localisation membranaire. En effet, la transfection du mutant de ER α S522A dans des cellules CHO (chinese hamster ovary) entraîne une diminution de 62% du pool de ER α localisé à la membrane, de la co-localisation avec la cavéoline-1, de la signalisation de ERK et de la prolifération cellulaire. Cependant, on ne retrouve pas d'effets sur l'activité transcriptionnelle de ER α (Razandi et al., 2003a). La sérine 522 semble donc essentielle aux voies non génomiques de ER α .

(iv) Dans le cas du processus de résistance au tamoxifène, il a été observé que ER α est relocalisé dans le cytoplasme des cellules. Dans les cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène, un taux plus important de ER α coimmunoprécipite avec EGFR alors que le niveau d'expression de ER α ne varie pas. De plus, dans les cellules résistantes, Src coimmunoprécipite avec EGFR et ER α . Le blocage de l'activité de Src induit une redistribution de ER α dans le noyau et une réduction de son interaction avec EGFR (Fan et al., 2007).

ii. Le récepteur GPR30

Le récepteur orphelin GPR30 (G protein-coupled receptor 30) a été identifié et cloné assez récemment (Carmeci et al., 1997). C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires (aussi appelé récepteur couplé aux protéines G) qui peut médier la réponse aux œstrogènes dans les cellules de cancers du sein ER α négatives (Filardo et al., 2000). Dans la lignée cellulaire SKBR3 (GPR30+,ER-), GPR30 est retrouvé à la membrane plasmique. La stimulation aux œstrogènes induit la liaison de GPR30 à une protéine G stimulatrice, ce qui augmente l'activité adénylate cyclase (Thomas et al., 2005). De plus, des cellules HEK-293 (GPR30-,ER-) transfectées par un ADN codant pour GPR30 expriment le récepteur GPR30 à la membrane plasmique et une stimulation à l'œstradiol induit une mobilisation calcique (Filardo et al., 2007).

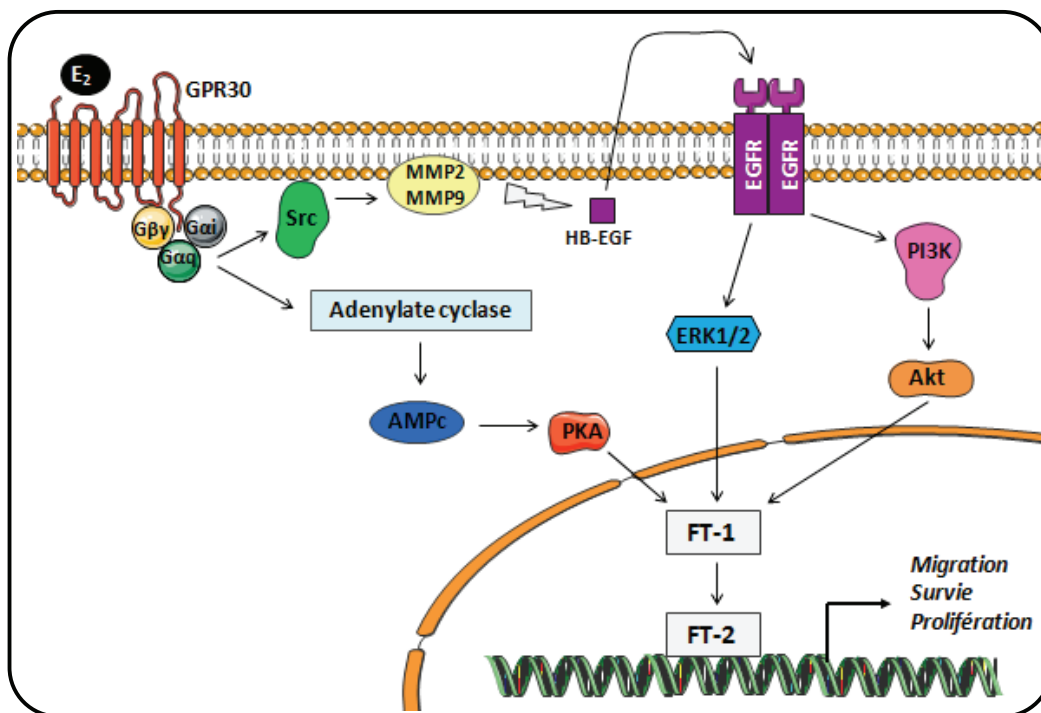


Figure 18 : La voie de signalisation de GPR30

FT1 : Facteurs de transcription tels que SRF, CREB ou ETS. FT2 : Seconde vague de facteurs de transcription
Adapté de (Maggiolini et al., 2010).

Il semble bien établi que GPR30 induit la production d'AMPc après stimulation œstrogénique (Thomas et al., 2005; Filardo et al., 2007). Différents travaux ont permis de montrer l'importance des protéines G (G α) (Thomas et al., 2005) et G $\beta\gamma$ (Filardo et al., 2000) dans cette voie de signalisation. Après stimulation œstrogénique, GPR30 stimule les protéines G et active, *via* la protéine Src, les métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, ce qui libère l'HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor). Ce dernier induit ensuite la phosphorylation de son récepteur (EGFR) et ainsi active la voie de signalisation des MAPK (Filardo et al., 2000; Thomas et al., 2005) (**Figure 18**). De plus, l'activation de GPR30 par les œstrogènes induit une mobilisation intracellulaire du calcium et la synthèse de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) dans le noyau (Revankar et al., 2005). Cela a pour conséquence l'activation de PI3K et d'AKT *en aval*. Les auteurs ont démontré que cette activation ne se fait pas *via* les protéines G.

Tandis que les événements liés à cette voie de signalisation ont lieu très rapidement après stimulation, de nombreuses évidences indiquent que GPR30 peut induire une signalisation transcriptionnelle à plus long terme (Prossnitz et al., 2009). Par exemple, Maggiolini et al. ont montré que dans les lignées de cancer du sein SKBR3 (ER-), les œstrogènes induisent l'expression de *c-fos* *via* une cascade de signalisation GPR30/EGFR/MAPK (Maggiolini et al., 2004). La signalisation de GPR30 induit l'activation rapide post-transcriptionnelle de différents facteurs de transcription tels que SRF (Serum response factor), CREB (C-AMP Response Element-binding) ou la famille ETS (E-twenty six), ce qui permet l'activation d'une seconde vague de facteurs de transcription tels que FOS, JUN et l'activation de nombreux gènes cibles (Pandey et al., 2009), pour revue (Maggiolini et al., 2010) (**Figure 18**).

Le rôle exact de GPR30 dans la physiologie est un peu moins clair. Aucun modèle murin ne présente de dysfonctionnement ou de problèmes structurels majeurs au niveau de la glande mammaire ou de la reproduction, mais laisse supposer un rôle clé au niveau des organes périphériques (Wang et al., 2008a; Otto et al., 2009). Cependant, une équipe a montré chez le hamster que GPR30 est exprimé dans l'ovaire durant le développement pré-natal et médie l'action de l'E₂ sur la formation des follicules primaires (Wang et al., 2008b). La découverte de ce récepteur est relativement récente et d'autres études doivent être entreprises. De plus, les récepteurs GPR30 humains et murins ont une similarité de seulement 87%, ce qui doit être pris en compte lors de l'analyse des résultats provenant de modèles murins.

iii. Les variants d'épissage de ER α

Les variants d'épissage de ER α pourraient aussi être impliqués dans la localisation cytoplasmique de ER α . Le variant ER α 46 est palmitoylé et une inhibition de la palmitoylation bloque sa localisation près de la membrane dans les cellules endothéliales (Li et al., 2003a). L'isoforme ER α 36, principalement cytoplasmique, induit les voies de signalisation non génomique des œstrogènes MAPK-dépendante (Wang et al., 2006; Zhang et al., 2011a). Cependant, le mécanisme moléculaire induisant cette localisation n'est pas clair. ER α 36 contient trois sites potentiels de myristoylation dans l'extrémité C-terminale qui lui est propre, mais d'autres modifications pourraient aussi expliquer cette localisation membranaire.

La nature du récepteur impliqué dans les voies non génomiques des œstrogènes reste encore controversée. Il semble clairement établi qu'il existe une fraction de ER α dans le cytoplasme. Cependant, certains excluent le fait que GPR30 puisse être un autre récepteur aux œstrogènes pouvant initier des voies non génomiques œstrogéno-dépendantes (Pedram et al., 2006). Cependant, les résultats énoncés ci-dessus, associés au fait que GPR30 peut lier l'E₂ (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005; E. Filardo et al., 2007), démontrent que GPR30 peut être impliqué dans les voies non génomiques œstrogéno-dépendantes, et être plus qu'un simple « collaborateur » de ER α (Levin et al., 2009). En effet, plusieurs groupes ont montré que des cellules ou des membranes isolées exprimant GPR30 lient l'E₂, alors que les cellules ou les membranes isolées n'exprimant pas GPR30 en sont incapables. La controverse fondamentale autour de GPR30 concerne le fait ou non de considérer GPR30 comme un récepteur aux œstrogènes. La preuve ultime viendra sûrement de l'analyse structurale de GPR30 lié à l'E₂. Toutefois, l'implication de GPR30 dans les voies non génomiques n'exclue pas la présence d'une fraction de ER α conventionnel dans le cytoplasme et *vice-versa*. Les données présentées en (i) indiquent clairement que ER α serait maintenu à la membrane grâce à un processus de palmitoylation et à des interactions avec de nombreux partenaires, tels que la cavéoline-1 ou la striatine.

Peu de choses sont connues sur les voies non génomiques induites par ER β . Cependant, la présence d'un pool de ER β au niveau de la membrane plasmique suggère qu'il pourrait aussi être impliqué dans les voies non génomiques et plus particulièrement *via* son association avec Src (Chambliss et al., 2002; Migliaccio et al., 2000).

b- Les protéines partenaires

ER α n'est ni une protéine kinase, ni une protéine adaptatrice. De ce fait, elle n'a pas la capacité d'induire la transduction des signaux extracellulaires. Elle doit donc s'associer à des protéines qui ont elles, ces capacités. Des dimères de ER α activent de multiples voies de signalisation *via* l'interaction de ER α avec différentes protéines dont la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, la tyrosine kinase Src ou encore d'autres adaptateurs protéiques.

i. Le complexe ER α /PI3K/Src.

Les protéines PI3K et Src font partie du cœur du complexe (Castoria et al., 2001). L'association entre PI3K et ER α a été en premier lieu mise en évidence dans les cellules endothéliales, induisant l'activation d'AKT et de eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (Simoncini et al., 2000). Par la suite, l'équipe d'Auricchio a montré que les œstrogènes induisent, rapidement et transitoirement, la formation d'un complexe contenant ER α /PI3K/Src (Castoria et al., 2001). Les œstrogènes induisent la stimulation de l'activité de PI3K, augmentant ainsi la production intracellulaire de phosphoinositides tels que le phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3). De plus, les œstrogènes permettent l'interaction entre ER α et Src, stimulant ainsi l'activité kinase de Src et induisant la voie de signalisation Src-dépendante (Castoria et al., 2001).

La phosphorylation de la tyrosine 537 de ER α est nécessaire à son association avec le domaine SH2 de Src (Migliaccio et al., 2000). La génération d'un peptide mimant la séquence de ER α phosphorylé sur la tyrosine 537 permet d'inhiber l'interaction entre ER α et Src, et donc la signalisation en aval incluant l'arrêt de l'expression de la cycline D1 et de la prolifération cellulaire (Varricchio et al., 2007). Ce peptide phosphorylé réduit aussi les effets protecteurs des œstrogènes contre l'apoptose. L'utilisation de ce peptide phosphorylé dans les cellules MCF-7 séquestre ER α dans le noyau, même après stimulation œstrogénique. De plus, un mutant portant la mutation Y537F (inhibant la phosphorylation) est exclusivement retrouvé dans le noyau des cellules (Castoria et al., 2012). La tyrosine 537 est faiblement phosphorylée de façon constitutive. L'association basale de Src et ER α est augmentée en présence d'œstrogènes, ce qui suggère qu'un pool de ER α est stabilisé dans le cytoplasme et forme un complexe plus stable qui permet la phosphorylation et l'activation de Src. Cependant, d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'interaction entre ER α et Src, (i) le groupe de B. Katzenellenbogen a montré que Src pouvait phosphoryler ER α sur d'autres résidus tyrosines (Likhite et al., 2006), (ii) l'isoforme ER α 36, dépourvu de tyrosine 537 est capable d'induire l'activation des voies non génomiques Src/MAPK. Les domaines d'interaction entre ER α et p85 ne sont pas connus.

Il existe une interrelation entre les activités kinase de Src et de PI3K. En effet, dans les cellules MCF-7 prétraitées par un inhibiteur de Src, les œstrogènes ne sont plus capables d'activer PI3K. L'activité de Src est donc essentielle pour la formation du complexe ternaire ER α /Src/PI3K (Cabodi et al., 2004; Castoria et al., 2001). Réciproquement, dans des cellules pré-traitées avec un inhibiteur ou un mutant dominant négatif de PI3K, les œstrogènes n'induisent plus d'augmentation de l'activité de Src (Castoria et al., 2001).

ii. p130^{Cas}

La protéine adaptatrice p130^{Cas} (Crk-associated substrate) est le substrat majoritaire de Src. p130Cas est une molécule de signalisation impliquée dans la liaison du cytosquelette à la matrice extracellulaire durant la migration cellulaire, l'invasion et la transformation cellulaire. Dans les cellules de cancer du sein humaines T47D, après stimulation œstrogénique, p130^{Cas} est transitoirement associée à ER α dans le macrocomplexe contenant Src et PI3K. L'association de p130^{Cas} à ER α a lieu à temps courts de stimulation aux œstrogènes et elle est dépendante de l'activation de Src. Ce complexe régule l'activation de la kinase Src, de la voie Erk1/2 MAPK et l'expression de la cycline D1 (Cabodi et al., 2004).

iii. MNAR

MNAR (Modulator of Nongenomic Activation of ER) est une protéine adaptatrice faisant partie du complexe ER α /Src/p85. L'étude de Barletta et al. a montré que MNAR interagit avec ER α au niveau de deux motifs N-terminaux LxxLL. La mutation de ces motifs empêche l'interaction entre ER α et MNAR, ainsi que l'activation de la voie Src/MAPK. Ces données démontrent donc que MNAR est une protéine « d'échaffaudage » qui en favorisant l'interaction ER α /Src, joue un rôle important dans l'activation de la signalisation Src-dépendante (Barletta et al, 2004). De plus ce complexe MNAR/Src/ER α serait essentiel au recrutement de p85 (Greger et al., 2007).

c- La signalisation non génomique et ses effets

De nombreuses études ont cherché à comprendre la signalisation non génomique œstrogéno-dépendante. Les complexes formés après stimulation aux œstrogènes activent deux voies majoritairement, la voie MAPK et la voie PI3K/AKT (**Figure 19**).

i. La voie MAPK

Après stimulation aux œstrogènes, on observe très rapidement l'interaction de ER α avec Src, ce qui stimule son activité tyrosine kinase et la cascade de signalisation *en aval*. Plus précisément, cela active la protéine RAS. Les protéines RAS jouent un rôle « d'interrupteur » au sein des voies de signalisation et oscillent entre deux états : un état actif où elles sont liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate), et un état inactif lorsque RAS est liée au GDP (Guanosine Di-Phosphate). RAS-GTP activée induit l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1. Cette première protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la kinase MEK. À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau où elle peut induire ses effets prolifératifs tels que la transcription de la cycline D1 (pour revue (Zasadowski et al., 2012)) (**Figure 19A**). L'activation de la voie des MAPK par les œstrogènes a été décrite dans différents modèles tels que les cellules nerveuses, les cellules endothéliales ainsi que le carcinome mammaire (pour revue (Hammes et al., 2007)).

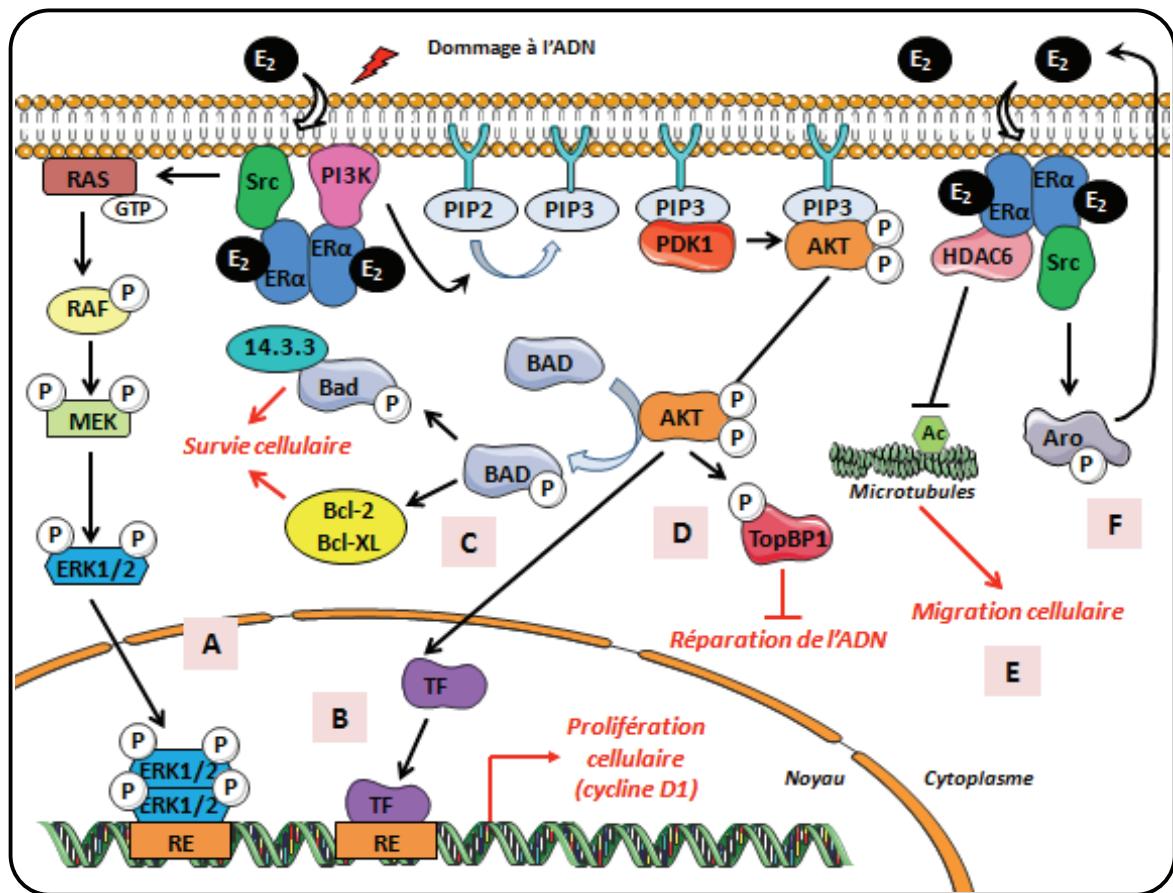


Figure 19 : Les voies de signalisation non génomiques

Rapidement après stimulation aux oestrogènes, ERα recrute Src et PI3K. Le complexe active la voie des MAPK qui a pour finalité l'activation de la prolifération cellulaire (A). AKT activée stimule la prolifération cellulaire (B) et la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD (C). Après un dommage à l'ADN et une stimulation aux oestrogènes, la voie PI3K/AKT est activée (D). AKT phosphorylé phosphoryle alors à son tour TopBP1 qui ne peut plus exercer son rôle dans la réparation de l'ADN. ERα est capable d'interagir avec HDAC6 qui peut inhiber alors l'acétylation des microtubules (E). Ces différentes voies peuvent être stimulées par l'activité de l'aromatase (F).

ii. La voie PI3K/AKT

Le traitement des cellules aux œstrogènes induit l'interaction entre la sous-unité régulatrice p85 et ERα, ce qui stimule l'activité lipide kinase de la sous-unité catalytique p100 et permet donc l'augmentation des phosphoinositides cellulaires, tel que PIP3. AKT est alors relocalisé à la membrane où il est activé par phosphorylation. Il va alors activer de nombreux substrats.

La voie PI3K/AKT induit une augmentation de la prolifération cellulaire en favorisant l'entrée en phase S après stimulation aux œstrogènes ainsi que la stimulation de la cycline D1 dans les cellules MCF-7 (Castoria et al., 2001) (Figure 19B).

Après stimulation œstrogénique, AKT phosphoryle la protéine pro-apoptotique BAD (BCL-2 antagonist of cell death), ce qui entraîne son activation par séquestration par la protéine 14.3.3 dans le cytoplasme. De plus, la phosphorylation de BAD, permet la libération des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Par ce mécanisme, les œstrogènes protègent la cellule de la mort cellulaire par apoptose (Fernando et al., 2004) (Figure 19C).

Les dommages à l'ADN activent un système de kinases telles que ATM (ataxia-telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related). Lors d'un dommage à l'ADN, après stimulation aux œstrogènes, ER α active la voie PI3K/AKT et AKT phosphoryle la protéine TopBP1 (Topoisomerase II Binding protein 1) ce qui l'empêche d'interagir avec ATR. Cela conduit à l'inhibition des points de contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Pedram et al, 2009a) (**Figure 19D**).

iii. Autres effets

Récemment, une étude a démontré un nouvel effet non génomique induit par l'œstradiol en utilisant une construction de ER α dépourvue de signal de localisation nucléaire permettant une expression membranaire du récepteur associé à Src. Très rapidement après stimulation aux œstrogènes, ER α interagit avec HDAC 6 (histone deacetylase) au niveau de la membrane induisant la déacétylation de la tubuline, ce qui contribue à la migration cellulaire et à l'agressivité des cellules de cancer du sein ER α positives (Azuma et al., 2009) (**Figure 19E**).

Catalano et al. ont identifié un autre rôle des voies non génomiques. Suite à l'activation de Src par les œstrogènes, l'aromatase est phosphorylée sur la tyrosine 361, ce qui augmente son activité. Il existerait donc une boucle autocrine entre l'œstrogène et l'aromatase qui pourrait être impliquée dans la tumorigenèse mammaire (Catalano et al., 2009) (**Figure 19F**).

En général, on présente les voies génomiques et non génomiques comme étant des voies de signalisation séparées. Cependant, ces voies de signalisation ne sont pas exclusives mais plutôt complémentaires, avec de nombreuses interconnexions. Certains décrivent d'ailleurs une réelle convergence entre ces deux voies de signalisation (pour revue (Björnström et al., 2005; Ordóñez-Morán et al., 2009)). Toutefois, plusieurs équipes ont tenté de décrypter les effets physiologiques propres à chaque voie de signalisation par différentes approches. L'équipe de Katzenelnbogen a créé des macromolécules appelées EDC (estrogen-dendrimer conjugates) qui permettent d'activer spécifiquement les voies non génomiques (Madak-Erdogan et al, 2008; Harrington et al., 2006). Ce modèle a permis de montrer que les voies non génomiques sont importantes à l'effet cardioprotecteur des œstrogènes et leur effet protecteur de la masse osseuse (Bartell et al, 2013; Chambliss et al, 2010). De même, l'équipe de Levin a généré un modèle de souris exprimant le domaine fonctionnel E de ER α directement à la membrane plasmique. Ils ont ainsi montré que l'expression membranaire de ER α n'est pas capable de réverser le phénotype anormal des souris ER α KO (système reproducteur anormal, glande mammaire atrophiée, augmentation de la masse graisseuse...) (Pedram et al, 2009b). Cependant, l'effet des œstrogènes sur le foie passerait par l'action non génomique des œstrogènes (Pedram et al., 2013). Toutefois, ces approches ne restent que partielles et ne reflète pas totalement la physiologie puisque ces modèles reposent sur des constructions ectopiques.

IV- Les modifications post-traductionnelles de ERα

En modulant de manière réversible les fonctions des protéines, les modifications post-traductionnelles (PTM) permettent leur diversité fonctionnelle. De ce fait, le décryptage des modifications post-traductionnelles de ERα (**Figure 20, Tableau 5**) est nécessaire à une meilleure compréhension de la signalisation œstrogénique, qu'elle soit génomique ou non génomique. L'étude bibliographique des modifications post-traductionnelles de ERα fait l'objet de trois revues écrites au cours de ma thèse, disponibles en annexe de ce manuscrit (Poulard et al., 2010; Le Romancer et al., 2011, 2012).

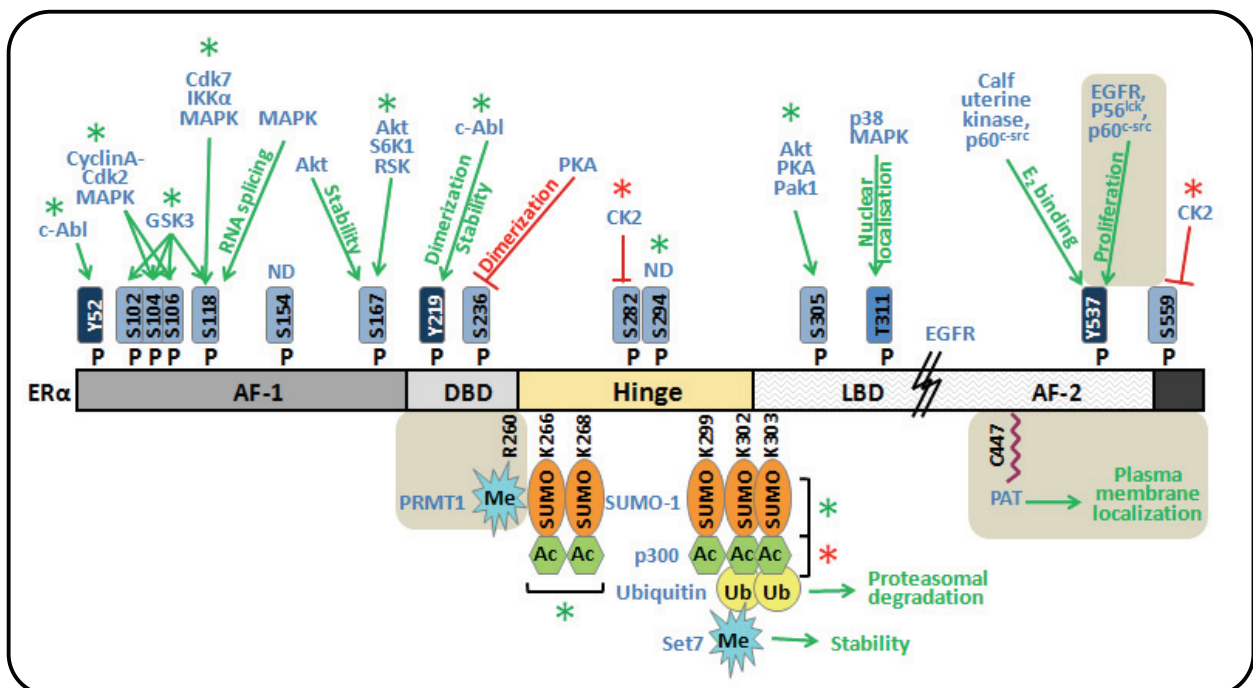


Figure 20 : Les modifications post-traductionnelles de ERα

Me : méthylation, P : phosphorylation, Ac : acétylation, Ub : ubiquitinylation, SUMO : sumoylation, la palmitoylation est représenté ainsi : $\sim\sim\sim$ Les fonctions des modifications sont représentées en vert pour les activations et en rouge pour les inhibitions. * : activation/inhibition de la transcription. Les modifications impliquées dans les voies non génomiques sont ombrées en gris. ND : Non déterminé. D'après (Le Romancer et al., 2011).

1. Les PTM qui régulent les voies génomiques de ERα

a- Phosphorylation

ERα subit de nombreuses phosphorylations, tout au long de sa protéine. Ces phosphorylations activent principalement l'activité transcriptionnelle. Comme nous l'avons vu précédemment, la sérine 118 peut être phosphorylée par les MAPK, régulant ainsi les voies génomiques de ERα de

façon œstrogéno-indépendante (Kato et al., 1995; Bunone et al., 1996). Cependant, ER α peut aussi être phosphorylé sur sa sérine 118 en présence d'œstrogènes, afin de stimuler la transcription génique (Chen et al., 2002; Medunjanin et al., 2005; Park et al., 2005). La phosphorylation de la sérine 167 par S6K1, en aval de la protéine de signalisation mTor, est elle aussi associée à l'activation de la transcription (Yamnik et al., 2009), tout comme la phosphorylation des sérines 104, 106 et 305 (Le Romancer et al., 2011).

D'autres propriétés de ER α sont affectées par la phosphorylation. (i) La phosphorylation de la sérine 236 par la protéine kinase A inhibe la capacité de dimérisation de ER α et donc de fixation à l'ADN (Chen et al., 1999b). La phosphorylation des sérines 104, 106 et 118 aurait quant à elles un effet positif sur la dimérisation (Sheeler et al., 2003). Il en est de même pour la phosphorylation de la tyrosine 219 par c-Abl. Cette phosphorylation en activant la dimérisation, la liaison à l'ADN, et la stabilité de ER α , augmente ainsi la transcription génique (He et al., 2010). (ii) La phosphorylation de la thréonine 311 par la kinase p38-MAPK inhibe son export nucléaire (Lee and Bai, 2002). (iii) La phosphorylation basale de la tyrosine 537 par des tyrosines kinases de la famille Src régule la fixation de l'œstradiol sur ER α (Arnold et al., 1997).

b- Acétylation

L'histone acétyltransférase (HAT) p300 avait déjà été décrite comme coactivateur transcriptionnel de ER α (Popov et al., 2007). Ce rôle avait été imputé à son activité enzymatique sur les histones. Cependant, il a aussi été montré qu'elle acétyle d'autres substrats, notamment ER α . p300 acétyle majoritairement les lysines 302 et 303 et plus faiblement la lysine 299. Cette acétylation est constitutive, et joue un rôle répresseur sur l'activité transcriptionnelle de ER α (Wang et al., 2001a). Puis, deux nouvelles cibles de p300 ont été identifiées, les lysines 266 et 268. Cette acétylation œstrogéno-dépendante stimule la liaison à l'ADN de ER α et augmente ainsi son activité transcriptionnelle (Kim et al., 2006). Cependant, aucun anticorps spécifique n'est disponible afin de conclure quant à la relevance de cette modification *in vivo*.

c- Ubiquitynylation

De nombreuses études montrent que le renouvellement de ER α induit par les œstrogènes, implique la voie de dégradation ubiquitine/protéasome (**Figure 21**). Bien que cette modification ait été découverte pour ER α depuis 1999 (Nawaz et al., 1999), ce n'est qu'en 2008 que les deux premières lysines cibles de l'ubiquitynylation en présence d'œstrogènes ont été identifiées : les lysines 302 et 303 (Berry et al., 2008). Les inhibiteurs du protéasome empêchent l'activité transcriptionnelle induite par l'E₂, ce qui montre l'importance de la dégradation protéosomale de ER α (Reid et al., 2003). Le renouvellement cyclique de ER α est un mécanisme utilisé par les cellules pour assurer une réponse continue aux changements de concentration du ligand.

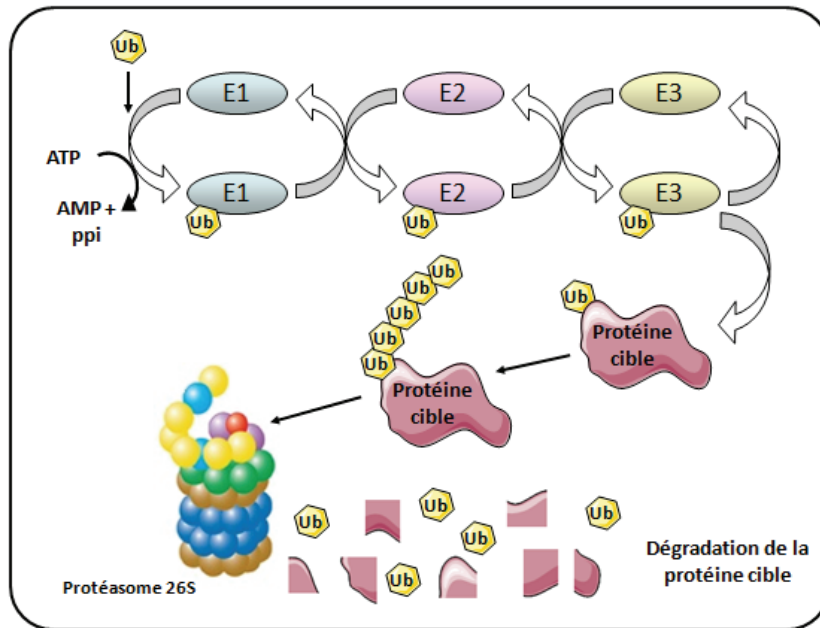


Figure 21 : Le processus d'ubiquitylation

L'ubiquitylation implique une cascade enzymatique dont une enzyme d'activation E1, une enzyme de conjugaison E2 et une enzyme de ligation E3. La poly-ubiquitylation entraîne essentiellement la dégradation de la protéine cible par le protéasome 26S (pour revue (Pickart et al., 2001)).

d- Sumoylation

Bien que ER α soit dépourvu de site consensus de sumoylation, notre équipe a montré que ER α était sumoylé dans sa région charnière sur les lysines 266, 268, 299, 302 et 303. La sumoylation de ER α est œstrogéno-dépendante et implique les protéines E3 ligases PIAS1 et PIAS3 (Protein inhibitors of activated STAT). La sumoylation de ER α augmente son activité transcriptionnelle car des mutants de ER α qui ne sont plus sumoylables, sont transcriptionnellement moins actifs que la protéine sauvage. Cette modification étant réversible et hautement dynamique (**Figure 22**), elle peut être un moyen de réguler l'assemblage et le désassemblage des complexes transcriptionnels liés à ER α (Sentis et al., 2005).

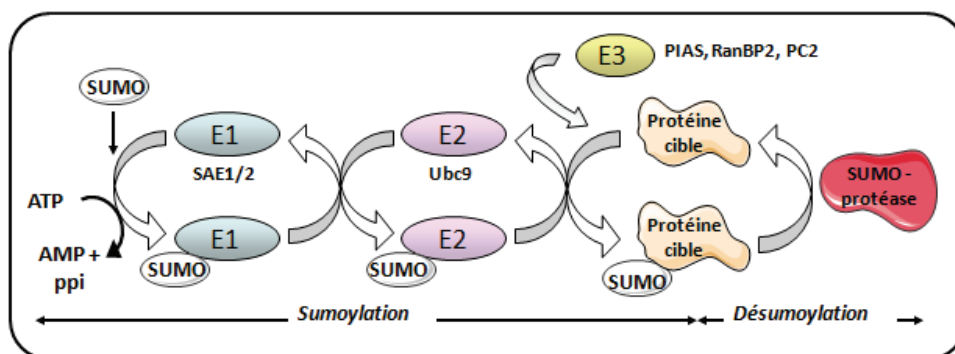


Figure 22 : Le processus de sumoylation

La sumoylation conduit à la liaison covalente de petits polypeptides nommés SUMO (« Small Ubiquitin-related modifier »), sur une lysine acceptrice d'une protéine cible, par des mécanismes enzymatiques similaires à ceux de l'ubiquitylation. Le processus de sumoylation est réversible et dynamique. (pour revue (Melchior, 2000)).

| AA | Modifications | Activateur | Enzymes | Fonctions |
|--------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Y52 | Phosphorylation | Ligand indépendant | c-Abl | Active la stabilité, transcription |
| S102 | Phosphorylation | Constitutive, E2 | GSK3 | Active la transcription |
| S104/ 106 | Phosphorylation | Constitutive, E2 Constitutive, E2, Tam E2, Tam, ICI, PMA E2 | GSK3 CycA/Cdk2 MAPK MAPK | Active la transcription Active la transcription Active la transcription Dimérisation |
| S118 | Phosphorylation | E2, Tam, ICI EGF, IGF-1 E2 ND E2 E2 Prolactine ROS E2 | ND MAPK Cdk7 MAPK GSK3 IKK α ND MAPK MAPK | Active la transcription Active la transcription Active la transcription Active l'épissage de l'ARN Active la transcription Active la transcription Active la transcription Sous-régulation Dimérisation |
| S154 | Phosphorylation | Constitutive, E2, EGF | ND | ND |
| S167 | Phosphorylation | Constitutive ROS EGF Insuline, PMA ND | Akt Akt p90 RSK S6K1 Akt | Active la transcription Sous-régulation Active la transcription Active la transcription Active la stabilité |
| S236 | Phosphorylation | Constitutive | PKA | Inhibe la dimérisation |
| Y219 | Phosphorylation | ND | c-Abl | Active la dimérisation, la liaison à l'ADN, la stabilité et la transcription |
| R260 | Méthylation | E2 | PRMT1 | Voies non génomiques |
| K266 | Acétylation Sumoylation | E2 E2, Tam | p300 SUMO-1 | Active la transcription Active la transcription, la liaison à l'ADN |
| K268 | Acétylation Sumoylation | E2 E2, Tam | p300 SUMO-1 | Active la transcription Active la transcription, liaison à l'ADN |
| S282 | Phosphorylation | E2 | CK2 | Inhibe la transcription |
| S294 | Phosphorylation | E2 | ND | Active la transcription |
| K299 | Acétylation Sumoylation | Constitutive E2, Tam | p300 SUMO-1 | Inhibe la transcription Active la transcription, la liaison à l'ADN |
| K302 | Acétylation Sumoylation Ubiquitinylation Méthylation | Constitutive E2, Tam Constitutive, E2, ICI Constitutive | p300 SUMO-1 Ubiquitine SET7 | Inhibe la transcription Active la transcription, la liaison à l'ADN Dégradation protéosomale Active la stabilité |
| K303 | Acétylation Sumoylation Ubiquitinylation | Constitutive E2, Tam Constitutive, E2, ICI | p300 SUMO-1 Ubiquitine | Inhibe la transcription Active la transcription, la liaison à l'ADN Dégradation protéosomale |
| S305 | Phosphorylation | ND ND ND | PAK1 PKA Akt | Active la transcription Active la transcription Résistance aux anti-aromatase |
| T311 | Phosphorylation | E2 | p38-MAPK | Localisation nucléaire |
| C447 | Palmitoylation | Constitutive | PAT | Localisation à la membrane plasmique |
| Y537 | Phosphorylation | E2 Constitutive Constitutive EGF | CU kinase Src Src EGFR | Liaison de l'E2 Dimérisation, liaison à l'ADN Liaison de l'E2 Prolifération |
| S559 | Phosphorylation | Constitutive | CK2 | Inhibe la transcription |

Tableau 5 : Les résidus modifiés de ER α et leurs fonctions

AA : acides aminés, ND : Non déterminé, ROS : reactive oxygen species, CK2 : Casein kinase 2, PMA : phorbol myristate acetate. D'après (Le Romancer et al., 2011).

e- Méthylation sur lysine

La méthyltransférase SET7 méthyle ER α au niveau de la lysine 302 située dans la région charnière, et stabilise le récepteur. Cette méthylation est nécessaire au recrutement de ER α au niveau des promoteurs des gènes cibles et à l'activation de la réponse transcriptionnelle induite par les œstrogènes. Il faut cependant noter que malgré l'utilisation d'un anticorps spécifique de cette forme modifiée de ER α , la méthylation de ER α n'a pas été montrée dans les cellules. Cela suggère que cette forme n'est pas majoritaire ou alors que le processus est transitoire, et qu'il est suivi d'une déméthylation très rapide (Subramanian et al., 2008).

2. Les PTM qui régulent les voies non génomiques de ER α

Notre équipe a montré que la méthylation des arginines est impliquée dans l'activation des voies non génomiques induites par les œstrogènes. En effet, ER α est méthylé par l'arginine méthyltransférase PRMT1 sur l'arginine 260 dans son domaine de liaison à l'ADN (Le Romancer et al., 2008). ER α méthylé est localisé exclusivement dans le cytoplasme des cellules, et est essentiel à la formation du macrocomplexe qui comprend ER α /Src/PI3K. Ce complexe active alors la protéine AKT par phosphorylation, qui est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire. La méthylation de ER α induite par les œstrogènes est dépendante de l'activation des kinases de la famille Src puisqu'elle est reversée par les inhibiteurs de tyrosine kinases de la famille Src, PP1 et SU6656. La protéine FAK (Focal adhesion kinase) fait aussi parti de ce complexe de signalisation. Connaissant le rôle des kinases Src/Fak dans la migration cellulaire, on peut imaginer l'implication du complexe ER α /Src/PI3K/FAK dans l'adhésion et la migration cellulaire. La méthylation de ER α induite par les œstrogènes est rapide et transitoire, ce qui suggère l'existence d'une régulation fine de ce processus, qui pourrait servir de contrôle physiologique de la réponse aux œstrogènes (Le Romancer et al., 2008, 2010).

Deux autres modifications, explicitées précédemment, sont impliquées dans la régulation des voies non génomiques de ER α . (i) ER α est palmitoylé sur la cystéine 447, ce qui permet son ancrage à la membrane plasmique. (ii) ER α est phosphorylé sur la tyrosine 537. En plus de son rôle dans la régulation de la liaison des œstrogènes (Arnold et al., 1997), cette phosphorylation favorise l'interaction entre ER α et Src (Migliaccio et al., 2000).

Dans le modèle proposé des voies non génomiques de ER α , sans hormone, une population de ER α est palmitoylée et ainsi localisée à la membrane plasmique *via* l'association avec la cavéoline-1. La liaison des œstrogènes sur leur récepteur induit un changement conformationnel qui empêche l'action de la palmitoyl acyltransferase (PAT) et diminue l'interaction ER α /cavéoline-1, facilitant ainsi le mouvement de ER α . De ce fait, ER α dimérique,

a- La sérine 118

Une forte expression de ER α phosphorylé sur la sérine 118 se retrouve associée à des tumeurs mammaires de bas grades, ayant des marqueurs de bon pronostic (Murphy et al., 2004). Concernant la valeur prédictive de cette modification, il existe une controverse quant à l'association entre cette phosphorylation et la réponse aux thérapies endocriniennes. Ces discordances peuvent s'expliquer par le fait que les anticorps utilisés sont différents et les cohortes de patientes de petites tailles. De plus, en 2009, deux études ont conclu que cette phosphorylation est associée à une réponse aux thérapies endocriniennes. La première étude sur une vaste cohorte randomisée a montré que la phosphorylation de la sérine 118 est un marqueur de réponse au tamoxifène (Kok et al., 2009) et une autre que cette modification est un marqueur de réponse aux anti-aromatases (Generali et al., 2009).

b- La sérine 167

Dans les cancers du sein primaires ER α +, la phosphorylation de la sérine 167 est associée à des facteurs de bons pronostics, à une augmentation de la survie globale ainsi que de la survie sans progression (Jiang et al., 2007). De plus, cette modification semble prédictive de la réponse à l'hormonothérapie (Yamashita et al., 2005).

c- L'arginine 260

Grâce à un anticorps spécifique de ER α méthylé, sa présence a été confirmée par immunohistochimie dans le cytoplasme des cellules mammaires. Il a aussi permis de montrer que ER α est faiblement méthylé dans les cellules épithéliales normales et hyperméthylé dans 50% des 164 tumeurs mammaires étudiées (Le Romancer et al., 2008).

d- La lysine 303

Une étude réalisée sur 267 tumeurs du sein invasives a montré que la mutation somatique dans le gène ER α (A908G) conduisant à la substitution de la lysine 303 en arginine, est retrouvée dans 50% des tumeurs et est associée à un mauvais pronostic. Cette mutation induit en effet une hypersensibilité des cellules aux œstrogènes (Herynk et al., 2007). Cela suggère que cette lysine hautement régulée (acétylation, sumoylation, ubiquitinylation) joue un rôle important dans la régulation de la fonction de ER α . De plus, une mutation de la lysine 303 est associée à une hypersensibilité aux anti-aromatases, qui est en partie liée à l'hyperphosphorylation de la sérine 305 adjacente (Barone et al., 2010).

e- La sérine 305

La phosphorylation de la sérine 305 semble jouer un rôle primordial dans le processus de résistance au tamoxifène. Dans les cellules de patientes résistantes au tamoxifène, une diminution du taux de la sous-unité inhibitrice de la kinase PKA induit son activation. Elle peut alors phosphoryler la sérine 305 de ER α (Michalides et al., 2004). Cette phosphorylation induit un changement conformationnel du récepteur, qui permet à ER α de s'associer avec le coactivateur SRC-1 malgré la présence de l'antagoniste, le tamoxifène, et d'induire la transcription des gènes cibles (Zwart et al., 2007). De ce fait, la phosphorylation de la sérine 305 conduit à un changement d'activité du tamoxifène, devenant alors un agoniste de ER α . Ces travaux ont été montrés *in vitro* par la technique du FRET (« Fluorescence resonance energy transfer ») et confirmés *in vivo* sur des tumeurs de patientes (Bostner et al., 2010; Kok et al., 2011). L'étude clinique de Bostner et al. sur une large série de tumeurs de patientes ménopausées a démontré que l'expression de ER α phosphorylé sur la sérine 305 associée à celle de PAK1 (p21-activated kinase 1), une autre enzyme phosphorylant PAK1, est corrélée à une moins bonne réponse au tamoxifène (Bostner et al., 2010).

Nous ignorons encore si ces modifications post-traductionnelles, dérégulées dans les cancers du sein sont une conséquence de la maladie ou si elles jouent un rôle dans le développement de la carcinogenèse. Cependant les données présentées précédemment et d'autres indiquent que ces PTM peuvent être considérées comme de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostics du cancer du sein. De ce fait, le décryptage de tous les sites modifiés et des mécanismes qui antagonisent la formation des PTM est important pour comprendre la régulation de ER α *via* ses modifications et celles de ses corégulateurs, dans le sein normal et si ces mécanismes sont dérégulés dans le cancer du sein.

4. Les PTM affectant les corégulateurs de ER α

ER α n'est pas le seul acteur de la signalisation œstrogénique à être modifié. La situation est plus complexe puisque les corégulateurs de ER α subissent également des modifications post-traductionnelles qui régulent les interactions moléculaires, la stabilité ou encore la localisation cellulaire, le tout régulant finement l'activation transcriptionnelle de ER α . En absence d'œstrogènes, l'arginine méthyltransférase CARM1 peut être phosphorylée par la PKA suite à une stimulation par l'AMPc, et ainsi interagir avec ER α , recrutant par la suite d'autres corégulateurs (Carascossa et al., 2010). Dans cette partie, nous détaillerons deux exemples de corégulateurs, le coactivateur SRC-3 et le corépresseur RIP140 qui subissent de nombreuses modifications en réponse aux œstrogènes. Les combinaisons de toutes les modifications de ER α et de celles de ses corégulateurs, permettent une fine régulation spatio-temporelle de la signalisation œstrogénique.

a- Le coactivateur SRC-3

Phosphorylation, méthylation, ubiquitinylation affectent le coactivateur SRC-3, modifiant ainsi les propriétés moléculaires de la protéine (**Figure 24**).

i. Régulation de la localisation cellulaire.

SRC-3 est une protéine qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme et ce trafic serait régulé par la phosphorylation. Une inhibition des MAPK induit un relocalisation cytoplasmique de SRC-3, tandis qu'une stimulation de la voie EGF augmente sa localisation nucléaire en induisant la phosphorylation de SRC-3 sur la thréonine 24 et les sérines 857 et 860. Ces modifications augmentent la transcription des gènes médiés par SRC-3 (Amazit et al., 2007) (**Figure 24A**).

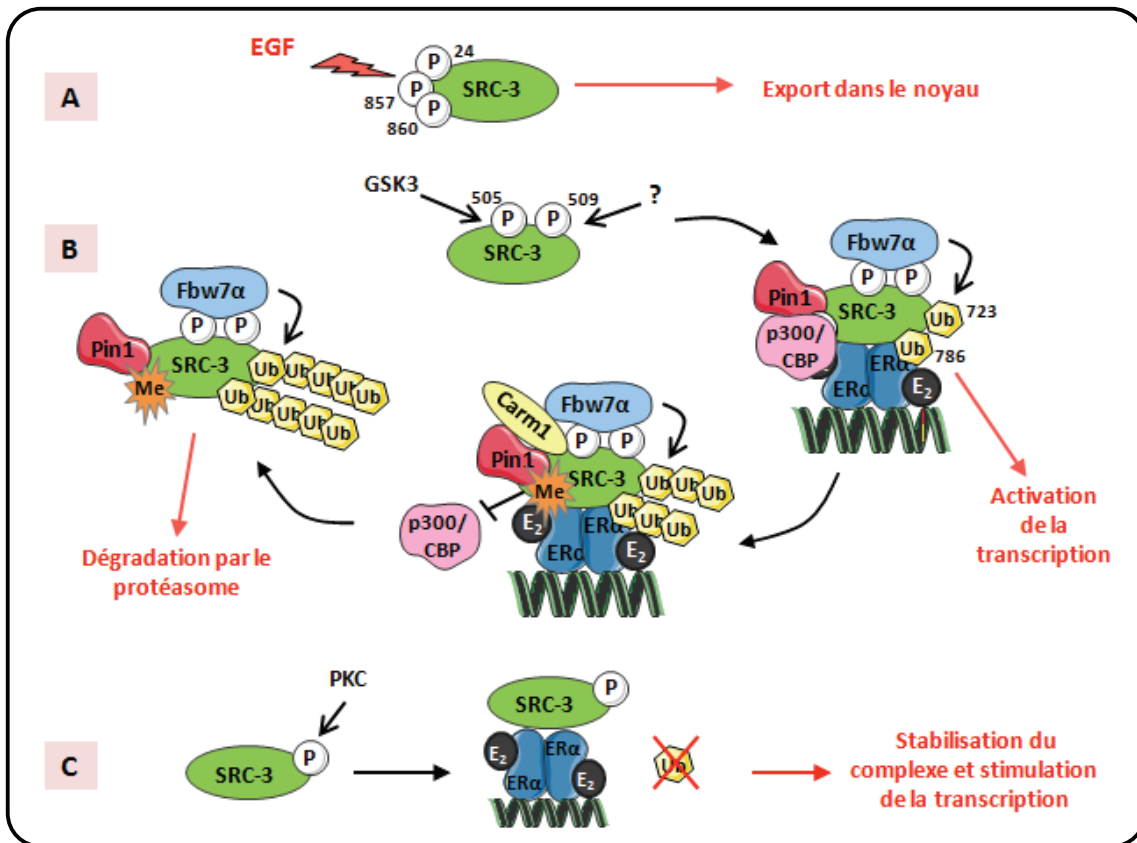


Figure 24 : Les PTM affectant SRC-3

A : Lorsque SRC-3 est phosphorylé, SRC-3 se relocalise dans le noyau. **B :** La phosphorylation de SRC-3 favorise le recrutement de l'ubiquitine ligase Fbw7α et le recrutement de Pin1. Au cours de la transcription Fbw7α rajoute des ubiquitines, et CARM1 méthyle SRC-3, le tout conduit à une déstabilisation du complexe et à une dégradation de SRC-3. Adapté en partie de (Wu et al., 2007). **C :** La phosphorylation de SRC-3 par PKC stabilise SRC-3 sur ERα.

ii. Régulation des interactions moléculaires

Deux groupes indépendants ont démontré que CARM1 modifie la protéine SRC-3 (Feng et al., 2006; Naeem et al., 2007). Cette modification a lieu dans le domaine C-terminal de la protéine

qui contient les sites de fixation pour CBP et CARM1. La méthylation de SRC-3 induite par les œstrogènes induit la dissociation de CBP et CARM1 de SRC-3, ainsi qu'une diminution de sa stabilité et participe donc à une augmentation de sa dégradation (**Figure 24B**).

iii. Régulation de la stabilité.

En plus de la méthylation qui participe à la dégradation de SRC-3, la phosphorylation affecte le système de dégradation médié par le protéasome, influençant ainsi la stabilité du coactivateur. SRC-3 est phosphorylée sur la serine 505 par la GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) et sur la serine 509 par une enzyme non identifiée. Ces modifications permettent le recrutement de Fbw7 α (F-box and WD-repeat-domain-containing 7 α), une E3 ubiquitine ligase qui va alors mono-ubiquitinyler les lysines 723 et 786. A ce moment là, SRC-3 est hyperactivée et se lie sur ER α activant ainsi la transcription. Les sites mono-ubiquitinylés sont ensuite progressivement poly-ubiquitinylés durant les tours suivants de transcription. Lorsque la chaîne contient quatre ou cinq ubiquitines, SRC-3 va être dégradée par le protéasome (Wu et al., 2007) (**Figure 24B**).

De plus, la phosphorylation de SRC-3 induit le recrutement de Pin1 (peptidyl-prolyl isomerase-1) qui catalyse l'isomérisation de résidus sérine/proline phosphorylés, ce qui induit le changement conformationnel de la protéine cible. Cela permet l'interaction entre SRC-3 et CBP/p300, participant à l'activation transcriptionnelle. Dans un second temps, Pin1 induit la dégradation de SRC-3 phosphorylée (Yi et al., 2005) (**Figure 24B**).

A l'inverse, la phosphorylation en C-terminal de SRC-3 par aPKC (atypical protein kinase C), qui est souvent surexprimée dans les cancers, stabilise le corégulateur sur ER α en inhibant son interaction avec le protéasome. Cela a pour effet d'induire les fonctions de SRC-3 et donc la transcription des gènes cibles de ER α afin d'augmenter la croissance cellulaire œstrogéno-dépendante (Yi et al., 2008) (**Figure 24C**).

b- Le corépresseur RIP140

RIP140 est bien connu pour être un corépresseur de l'activité de ER α après stimulation aux œstrogènes. Méthylation, acétylation et phosphorylation affectent différemment la protéine afin soit d'augmenter son activité répressive, soit au contraire de l'inhiber, régulant ainsi l'activité transcriptionnelle de ER α (**Figure 25**).

i. Augmentation de l'activité répressive.

Deux sites de phosphorylation sur le domaine N-terminal de RIP140 ont été identifiés. La phosphorylation des résidus thréonines 202 et 207 induite par les MAPK augmente l'activité répressive de RIP140 en simulant le recrutement des histones déacétylases (Gupta et al., 2005).

Par spectrométrie de masse, trois sites de méthylation sur lysine de RIP140 ont été mis en évidence, les lysines 591, 653 et 757. Différentes mutagénèses ont permis de montrer que la méthylation de RIP140 sur ces sites augmenterait l'activité répressive de RIP140 (Huq et al., 2009) (**Figure 25A**).

ii. Activation de la transcription.

Trois arginines de RIP140 sont décrites mono-méthylées par PRMT1, les arginines 240, 650 et 948. Ces modifications inhibent l'activité répressive de RIP140 par deux mécanismes. (i) La méthylation de l'arginine 240, localisée dans le domaine d'interaction avec HDAC3, réduit les fonctions répressives de RIP140. (ii) Ces trois modifications augmentent l'interaction de RIP140 avec CRM1, un composant de la machinerie d'export du noyau vers le cytoplasme. La protéine RIP140 est donc exportée dans le cytoplasme ce qui réduit sa fonction nucléaire répressive (Huq et al., 2006). La mutation des sites de méthylation sur lysine (591, 653 et 757) augmente la méthylation sur arginine, suggérant une interrelation entre la méthylation sur lysine et arginine suivant le contexte physiologique (Huq et al., 2009).

RIP140 peut aussi être acétylée sur la lysine 446. Cette modification est réalisée par CBP et inhibe l'interaction de RIP140 avec CtBP1, limitant ainsi son activité transrépressive (Vo et al., 2001) (**Figure 25B**).

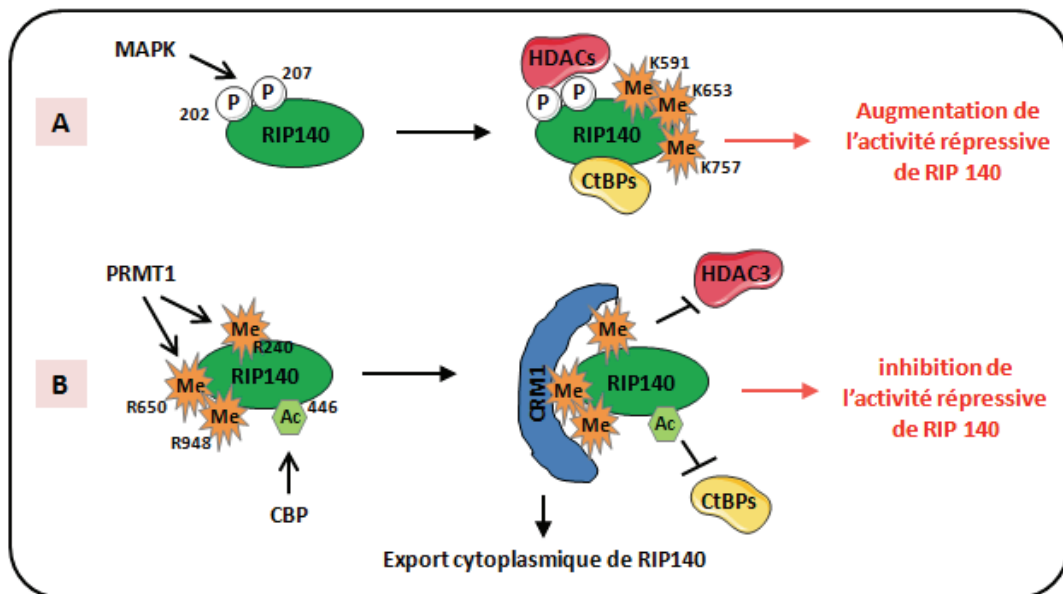


Figure 25 : Les PTM affectant RIP140

A : La phosphorylation et la méthylation sur lysine de RIP140 induisent une augmentation de son activité répressive.

B : La méthylation sur arginine et l'acétylation inhibe l'activité répressive de RIP140.

Chapitre 3 : Thérapies et mécanismes de résistance

Le cancer du sein est une maladie complexe et diverse, qui nécessite l'utilisation de différentes approches thérapeutiques. La chirurgie reste l'arme majeure couplée ou non à la radiothérapie. A côté de ces traitements locaux, il existe des traitements systémiques non ciblés comme la chimiothérapie ou ciblés comme l'hormonothérapie et les traitements ciblant HER-2. Ces thérapies ciblées ont constitué des avancées majeures dans la prise en charge des patientes permettant d'améliorer de façon significative leur survie.

I- Les traitements du cancer du sein

La chirurgie et la radiothérapie permettent le contrôle local de la tumeur. Lorsque la tumeur est trop volumineuse, on entreprend une thérapie néo-adjuvante afin de diminuer la taille de la tumeur avant l'intervention chirurgicale. Suite au contrôle local de la maladie, un traitement systémique est proposé pour diminuer le risque de rechute métastatique.

1. La chirurgie

La chirurgie du cancer du sein concerne la glande mammaire mais aussi l'aisselle. Deux types d'interventions chirurgicales peuvent être pratiquées sur le sein : la tumorectomie (chirurgie mammaire conservatrice) ou la mastectomie (chirurgie mammaire non conservatrice). Dans les deux cas, l'exérèse du ganglion sentinelle ou le curage axillaire sont réalisés afin de déterminer si les cellules cancéreuses ont pénétré le système lymphatique. Après une mastectomie, une reconstruction du sein est proposée à la patiente. Elle peut être immédiate ou différée.

2. La radiothérapie

La radiothérapie du sein est généralement complémentaire de l'acte chirurgical, en cas de traitement conservateur ou si la tumeur est très volumineuse. Elle prévient les rechutes locales. Lorsque l'analyse des ganglions prélevés révèle des cellules cancéreuses, une radiothérapie des chaînes ganglionnaires est aussi pratiquée. Dans tous les cas, une radiothérapie externe est pratiquée. Les rayons sont émis par un accélérateur linéaire de particules situé à proximité de la patiente. Dans certains cas très rares, une curiethérapie peut être pratiquée. Dans ce cas, la source radioactive est insérée au sein même de la tumeur à l'aide de petits cathéters, afin de cibler spécifiquement la tumeur.

3. La chimiothérapie

Administrée par voie intraveineuse le plus souvent, la chimiothérapie permet de détruire les cellules cancéreuses en prolifération. De nombreux médicaments peuvent être utilisés dans le traitement du cancer du sein. Le plus souvent, plusieurs médicaments sont utilisés en même temps, on parle de poly-chimiothérapie. Voici une liste non exhaustive de certains agents de chimiothérapie utilisés en clinique :

(i) Le méthotrexate est un anti-métabolite qui inhibe la dihydrofolate réductase, l'enzyme capitale du métabolisme de l'acide folique. Il bloque la réplication en phase S.

(ii) Le fluoro-uracile est un anti-métabolite qui bloque l'activité de la thymidylate synthétase et qui a la capacité de s'incorporer à l'ARN, induisant des erreurs dans la transcription.

(iii) La doxorubicine et l'épirubicine, de la famille des anthracyclines, sont des agents intercalants de l'ADN et des inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II. Ces molécules sont produites par des bactéries du genre *Streptomyces*.

(iv) Le cyclophosphamide fait partie de la famille des agents alkylants qui, en ajoutant des groupements alkyles à l'ADN, rend la réplication impossible.

(v) Le paclitaxel et le docétaxel, de la famille des Taxanes, inhibent la dépolymérisation des microtubules, ce qui bloque la mitose.

On associe habituellement le fluorouracile à un anthracycline ou au cyclophosphamide, un taxane au cyclophosphamide, une anthracycline au cyclophosphamide et au méthotrexate.

4. Les thérapies ciblées

L'inhibition de certaines voies de signalisation à l'aide d'hormonothérapie, d'anticorps monoclonaux humanisés ou encore en ciblant des voies de signalisation spécifiques sont des pistes bien avancées dans le traitement du cancer du sein.

a- L'hormonothérapie

i. Anti-œstrogènes

Les anti-œstrogènes peuvent être classés en deux grands groupes (**Figure 26**).

- Le type I (ou SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator), englobe le tamoxifène et ses analogues (raloxifène, toremifène and arzoxifène) ou ses métabolites. Ils agissent comme antagonistes ou parfois comme agonistes selon le tissu et le contexte cellulaire.
- Le type II (ou SERD : Selective Estrogen Receptor Downregulators) regroupe les anti-œstrogènes purs du récepteur aux œstrogènes, qui sont dépourvus de toute propriété agoniste.

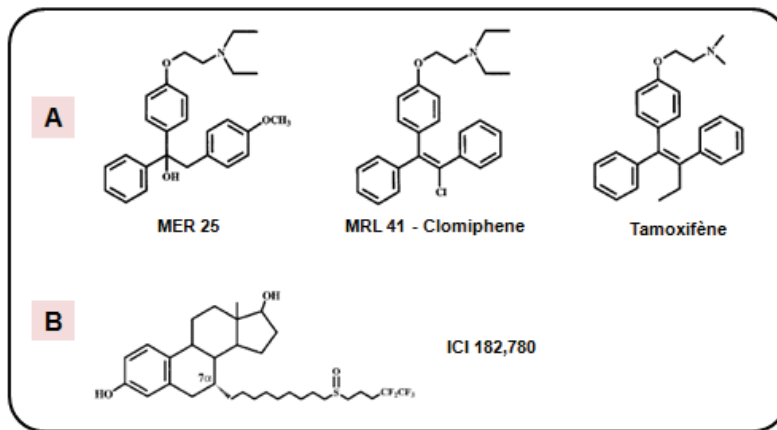


Figure 26 : La structure des anti-œstrogènes

A : Structures du MER 25, du clomiphène et du tamoxifène (des triphényléthylènes). **B :** Structure de l'ICI 182,780.

Au moins 70% des tumeurs mammaires sont hormonosensibles. Les premiers succès thérapeutiques de Beatson datent de 1896 et consistaient à retirer chirurgicalement les ovaires, lieu de production des œstrogènes (Beatson et al., 1896). En 1963, L. Lerner expose pour la première fois l'avancée de ses travaux sur le développement des anti-œstrogènes (Lerner et al., 1964). Son laboratoire a découvert le premier anti-œstrogène non stéroïdien, le MER-25 (ethantoxytripetol). Ce composé en bloquant l'action des œstrogènes chez toutes les espèces testées avait cependant un effet faible et transitoire sur l'action des œstrogènes. Le MER-25 ne deviendra jamais un agent clinique utile du fait de sa forte toxicité et de son faible potentiel de blocage de la signalisation œstrogénique (Lerner et al., 1981).

Un autre triphenylethylene, le MRL-41, a ensuite été identifié. Il s'est avéré très prometteur pour l'induction de l'ovulation féminine (Greenblatt et al., 1962; Holtkamp et al., 1960). Le MRL-41, mieux connu sous le nom de Clomiphène, est la thérapie standard pour le traitement de l'infertilité chez les femmes qui n'ovulent pas. Après 1964, les progrès dans la compréhension de l'action des anti-œstrogènes et leur utilisation en clinique a été lente et largement ignorée.

Ce n'est qu'à la fin des années 70 qu'un autre triphényléthylène, le tamoxifène, a été identifié et utilisé en clinique pour le traitement du cancer du sein (Jordan et al., 1994; Lerner et al., 1990). Le tamoxifène a été la première et la plus grande réussite en thérapie ciblée anti-cancéreuse. Utilisé en clinique depuis 1984, il diminue de près de moitié le taux de rechute du cancer du sein et réduit par un tiers le taux de mortalité de la maladie chaque année (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group., 2012). Le tamoxifène se fixe à ER α pour former un complexe qui n'est pas complètement actif. Le complexe Tam/ER α change la structure tertiaire du récepteur, le rendant seulement en parti actif et ce fait, il ne peut pas orchestrer l'activation génique que réaliserait le complexe E₂/ER α (Jordan et al., 1984; Metzger et al., 1988). De plus, le complexe Tam/ER α recrute des corepresseurs et des histones déacétylases (HDACs), ce qui induit la recompaction de la chromatine, l'arrêt de la transcription et l'inactivation des gènes cibles des œstrogènes (**Figure 27A**).

Cette molécule a bien un effet inhibiteur des œstrogènes au niveau de la glande mammaire, mais il comporte une activité œstrogéno-mimétique délétère au niveau de l'endomètre (augmentation du risque du cancer de l'utérus), et bénéfique sur le capital osseux.

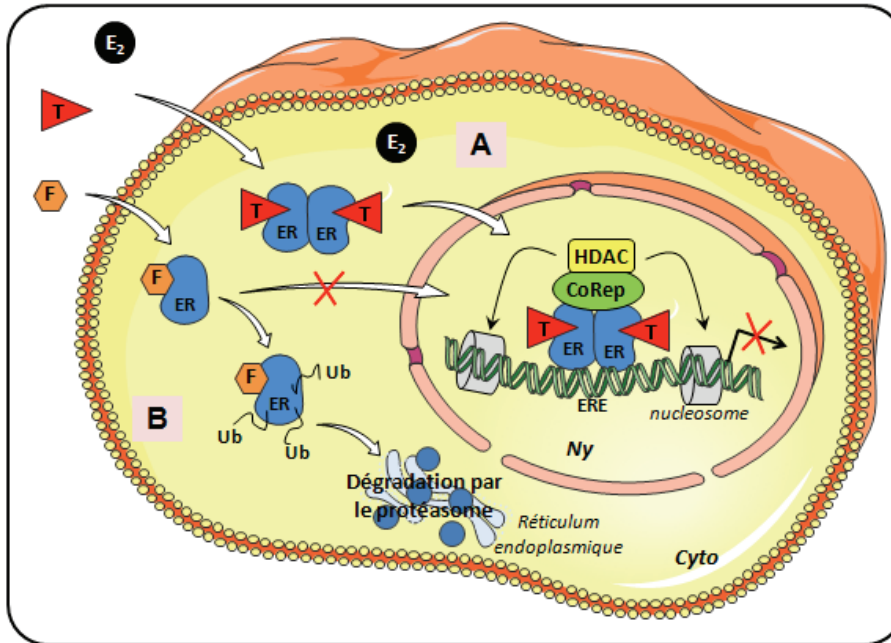


Figure 27 : Les mécanismes d'action des anti-œstrogènes.

A : Au niveau des ERE, le complexe ER α /Tamoxifène (T) recrute des corépresseurs (CoRep), induisant l'arrêt de la transcription. **B :** En tant qu'antagoniste pur, le fulvestrant (F) induit la dégradation de ER α .

Les anti-œstrogènes purs ont été découverts par Wakeling et ses collègues dans les années 80 (Wakeling et al., 1987). Le composé ICI 182,780 est le plus actif (Wakeling et al., 1991). Lorsqu'il se lie à ER α , l'ICI 182,780 empêche son transport dans le noyau. Le complexe ainsi formé va dans le réticulum endoplasmique. ER α est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome (Dauvois et al., 1993) (**Figure 27B**). Ce composé appelé Fulvestrant (ou Faslodex) est utilisé pour le traitement des femmes post-ménopausées atteintes de cancer du sein métastatiques hormono-sensibles ayant rechuté sous tamoxifène (Howell et al., 1995, 1996).

Cependant, après arrêt du traitement, les effets inhibiteurs de tous les anti-œstrogènes sont reversés par les œstrogènes. L'efficacité de ces drogues est donc limitée (Marsaud et al., 2003).

ii. Anti-aromatases

D'autres thérapies endocriniennes plus récentes ont été développées ciblant la synthèse des œstrogènes, les anti-aromatases. L'aromatase est l'enzyme qui permet la conversion des androgènes (tels que la testostérone et l'androstènedione) en œstrogènes (tels que l'œstradiol et l'œstrone), la source ultime d'œstrogènes stéroïdiens. L'utilisation d'anti-aromatase (tel que l'anastrozole ou le létrozole) permet de réduire la production d'œstrogènes dans les tissus

périphériques et notamment dans le tissu adipeux. Bloquer la production d'œstrogènes reste une option pour les femmes non ménopausées. En effet, chez la femme non ménopausée, la source majeure d'œstrogènes provient des ovaires et non des tissus périphériques. En revanche, chez les femmes ménopausées, l'ovaire n'étant plus la principale source d'œstrogènes, on utilise les anti-aromatases pour bloquer la production d'œstrogènes par les tissus périphériques (surrénales et tissu adipeux) (Simpson et al., 2002). Cela permet l'utilisation avec succès des anti-aromatases dans le traitement des femmes ménopausées atteintes de cancer du sein avancé (Dowsett et al., 2010). L'anastrozole et le létrozole ont une forte activité anti-proliférative. Les anti-aromatases peuvent aussi être utilisés pour le traitement des cancers du sein devenues secondairement résistants aux anti-œstrogènes.

Les effets secondaires après un traitement aux anti-aromatases sont différents de ceux du tamoxifène, se traduisant par des événements musculo-squelettiques et des fractures du fait d'une aggravation importante de l'ostéoporose (Harper-Wynne et al., 2002).

b- Les inhibiteurs de la voie mTor

La voie de signalisation AKT/mTor (pour mammalian target of rapamycine) est un régulateur clé de la prolifération cellulaire et de la survie. Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) activent PI3K *via* la liaison avec des adaptateurs protéiques tels que IRS1. PI3K phosphoryle PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) pour générer PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate), dans une réaction qui peut être réversée par PTEN. Les phospholipides produits favorisent le recrutement à la membrane de la kinase AKT, qui est alors phosphorylée (et donc activée) soit par PDK1 (3-phospho-inositide dependent protein kinase 1) sur la sérine 308 soit par le complexe mTORC2 sur la sérine 473. AKT active alors le complexe mTORC1 *via* de multiples sites de phosphorylation de TSC2, empêchant ainsi TSC2 d'agir comme une GAP (GTPase-activating protein) pour Rheb. Rheb-GTP s'accumule et active mTORC1, qui phosphoryle alors ses cibles en aval telles que les protéines 4E-BP1 et S6 kinases. La phosphorylation de 4E-BP1 inhibe l'interaction 4E-BP1/eIF4E, libérant ainsi eIF4E qui peut alors initier la traduction protéique. La phosphorylation de S6K1 de son côté active la synthèse protéique. De plus, AKT peut aussi activer mTORC1 en phosphorylant PRAS40, levant ainsi l'inhibition de mTor médiée par PRAS40. Il existe des rétro-contrôles négatifs. S6K1 phosphoryle en retour IRS1, induisant sa protéolyse. S6K1 phosphoryle aussi Rictor inhibant ainsi mTor2 et donc l'activation d'AKT (**Figure 28**) (Manning et al., 2007).

Les différentes interactions dans cette voie de signalisation entre mTORC1, mTORC2 et PI3K assurent une balance très importante pour la régulation de la croissance cellulaire. Une dérégulation de la voie AKT/mTor crée un environnement favorable pour le développement et la progression du cancer du sein. Elle est associée au développement de la résistance aux thérapies endocriniennes et au Trastuzumab sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement (Chiang et al., 2007; Margariti et al., 2011).

Une meilleure connaissance de cette voie de signalisation a permis de développer des molécules inhibant des protéines clés, les inhibiteurs de la voie mTor (**Figure 28**).

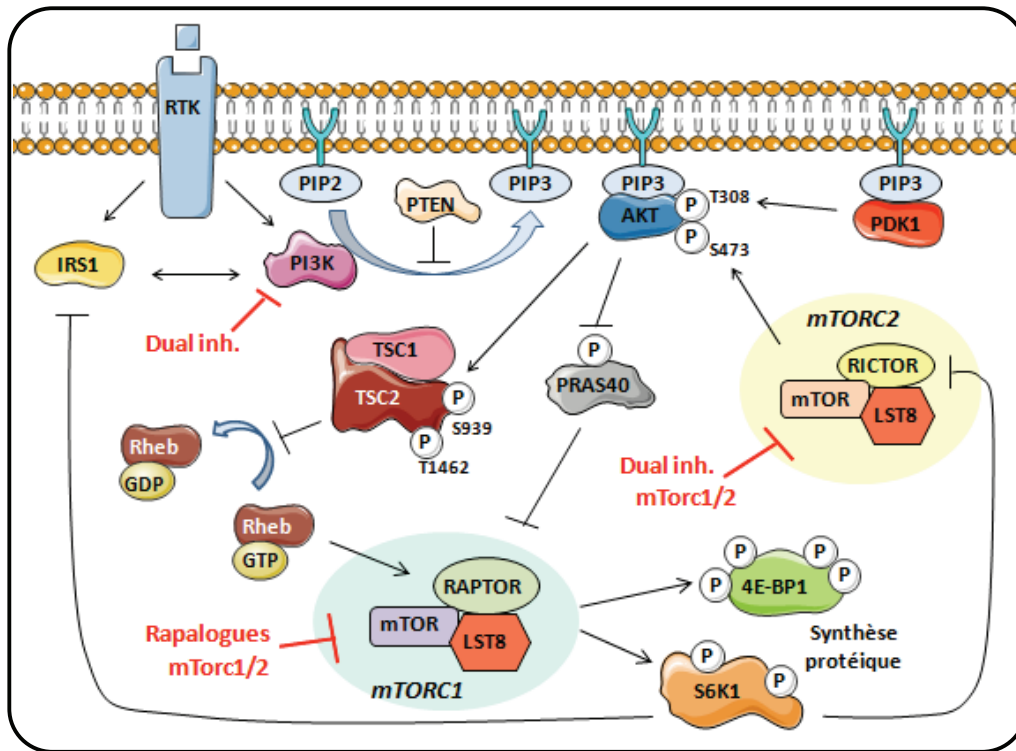


Figure 28 : La voie mTor

La première génération d'inhibiteurs de mTor sont les rapalogues. Ces molécules inhibent mTORC1, ce qui inhibe totalement S6K1 et partiellement 4EBP1. L'Everolimus (aussi appelé RAD001), fait parti de cette famille des inhibiteurs de mTor. Il a démontré une efficacité clinique lors d'essais de phase I et II, pour le traitement de cancers du sein (i) de type HER2+ en combinaison avec le trastuzumab, (ii) HER2- en combinaison avec la chimiothérapie, (iii) ER+ en combinaison avec l'hormonothérapie (Bachelot et al., 2012; Barnett et al., 2012). Dans des lignées cellulaires de cancer du sein, il a été montré que l'éverolimus était capable de restaurer la sensibilité au traitement endocrinien (Beeram et al., 2007). En raison de ces résultats encourageants, l'éverolimus a fait l'objet d'une étude de phase III très prometteuse appelée BOLERO (Brest Cancer Trials of Oral Everolimus) pour le traitement de femmes atteintes de cancers du sein HER2+/ER+ (Campono et al. 2013).

La deuxième génération d'inhibiteur de mTor sont ceux que l'on appelle mTor1/2 qui inhibent les deux complexes mTor minimisant les mécanismes de rétro-contrôles (Chresta et al., 2010). Ils diminuent l'activation d'Akt et diminuent la phosphorylation de 4E-BP1.

La troisième génération d'inhibiteur de mTor sont appelés « Dual inhibitor » puisqu'ils inhibent le complexe mTORC1/2 et PI3K. De cette façon, aucun rétro-contrôle n'est possible, ni sur mTORC, ni sur les récepteurs à tyrosine kinase. Le développement du BEZ235 (un double inhibiteur) est très prometteur comme nouvelle approche thérapeutique (Wander et al., 2011).

c- Les anticorps monoclonaux humanisés

i. Anti-HER2

Après la mise en évidence du mauvais pronostic des cancers du sein surexprimant HER-2, de nombreux groupes ont travaillé sur une stratégie de blocage du fonctionnement de HER-2, et de cette voie de signalisation. Le progrès de la recherche a permis de concevoir un anticorps monoclonal humanisé ; Trastuzumab (ou Herceptine), qui cible le domaine extracellulaire de HER-2 (Carter et al., 1992). Cet anticorps, utilisé pour le traitement des cancers du sein HER-2 positifs en complément de la chimiothérapie, a donné des résultats spectaculaires en situation métastatique, néoadjuvante et adjuvante (Baselga et al., 1998). C'est le premier traitement par anticorps monoclonal utilisé en routine en clinique. L'anticorps se lie à la région extracellulaire de la protéine HER-2. Cette liaison (i) bloque sa dimérisation (Junttila et al., 2009), (ii) entraîne son internalisation et sa dégradation *via* l'activation de l'ubiquitine ligase c-Cbl (Klapper et al., 2000), (iii) stimule le processus d'ADCC (Antibody-dependant cellular cytotoxicity) en attirant les cellules immunitaire sur le site tumoral (Arnould et al., 2006), et (iv) inhibe les voie MAPK, PI3K/Akt, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire, et donc de la prolifération cellulaire (Yakes et al., 2002). Ces différents mécanismes bloquent l'activation de HER-2 et permettent donc de ralentir la croissance tumorale (**Figure 29**).

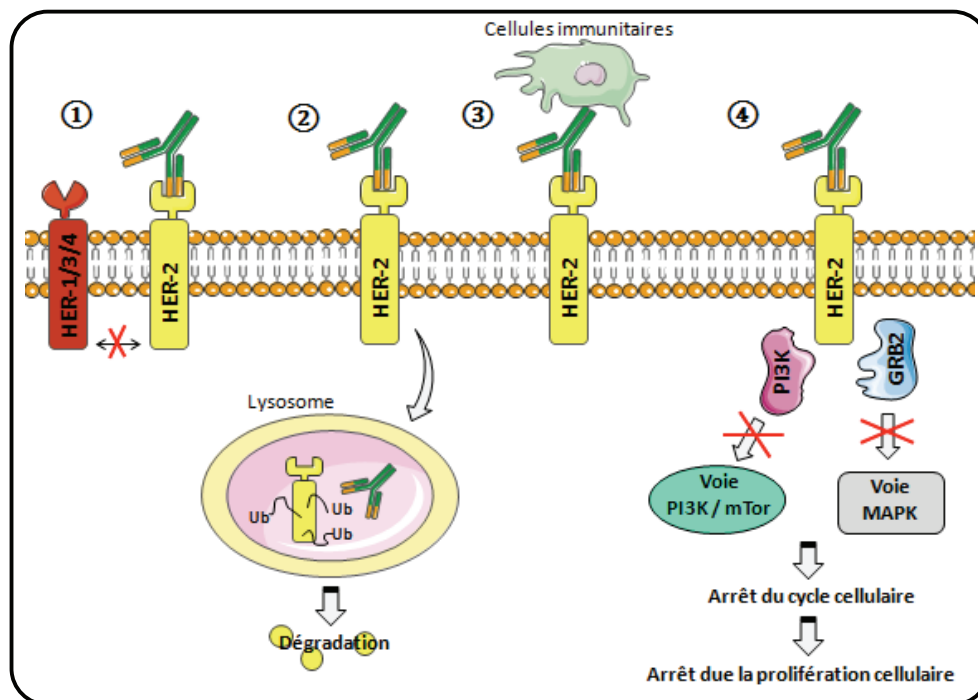


Figure 29 : Les mécanismes d'action du Trastuzumab

1 : Le trastuzumab inhibe la dimérisation de HER-2, 2 : Il induit son internalisation et sa dégradation, 3 : Il stimule le processus d'ADCC en recrutant des cellules immunitaires, 4 : On observe l'arrêt des signalisations MAPK, PI3K.

Du fait des mécanismes de résistance au Trastuzumab, une stratégie alternative à ce traitement a été recherchée. De petites molécules inhibitrices qui entrent en compétition avec l'ATP pour la

fixation au domaine de liaison de l'ATP dans la portion intracellulaire des récepteurs à tyrosine kinase ont donc été développées (Rusnak et al., 2001a). Le Lapatinib fait parti de ces molécules inhibitrices de tyrosines kinases HER-2 et EGFR (Rusnak et al., 2001b). Une étude récente a permis de montrer que le Lapatinib utilisé en combinaison avec le Paclitaxel offre un avantage clinique significatif par rapport au groupe traité uniquement avec le Paclitaxel (Guan et al., 2013).

Le Trastuzumab et le Lapatinib ont tous les deux des mécanismes d'action différents pour bloquer HER-2. Des études cliniques ont démontré que ces deux molécules aux effets complémentaires et synergiques pouvaient apporter un bénéfice clinique supplémentaire aux patientes lorsqu'elles étaient associées (Baselga et al., 2012; Blackwell et al., 2010).

ii. Anti-VEGF

La néoangiogénèse, c'est-à-dire la formation dans la tumeur de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, fournit l'énergie et les nutriments essentiels pour la prolifération des cellules tumorales. Cela fait de l'angiogénèse un aspect critique de la progression tumorale et de la formation de métastases. On estime que l'angiogénèse est requise pour supporter la croissance d'une tumeur de 1 ou 2 mm³. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est l'acteur principal de l'angiogénèse (Leung et al., 1989).

Le Bévacicumab (commercialisé sous le nom d'Avastin) est la première drogue anti-angiogénique approuvée par les autorités de santé. Cet anticorps monoclonal humanisé a été conçu pour se fixer au VEGF, empêchant ainsi son action sur sa cible (Presta et al., 1997). Par conséquent, les cellules cancéreuses ne peuvent pas développer leur propre circulation sanguine et sont privées d'oxygène et de nutriments, ce qui favorise le ralentissement de la croissance des tumeurs. Bien que les études cliniques aient démontré qu'une monothérapie au Bévacicumab était inefficace, de nombreuses études montrent l'efficacité de cette molécule en combinaison à la chimiothérapie (Gerber et al., 2005). Cette combinaison augmente la survie de patientes atteintes de cancers du sein métastatique. Cependant aucun bénéfice majeur sur la survie globale n'a été décrit et les patientes rechutent inévitablement, résultat d'une résistance acquise.

II- Les mécanismes de résistance aux traitements

Quel que soit le traitement utilisé, une résistance à cette drogue peut apparaître. Tous les mécanismes de résistance aux traitements ne sont pas complètement compris, en voici quelques uns.

1. Résistance à l'hormonothérapie

Les thérapies endocriniennes ont pour objectif de bloquer les effets prolifératifs induits par les œstrogènes. Le cas le plus décrit de résistance à l'hormonothérapie reste inévitablement le tamoxifène, qui n'est de ce fait jamais donné plus de 5 ans aux patientes.

Le tamoxifène est utilisé en situation adjuvante, néoadjuvante et métastatique de traitement des tumeurs du sein ER α + depuis de nombreuses années. Cependant, toutes les tumeurs exprimant ER α ne sont pas sensibles au tamoxifène, c'est ce que l'on appelle la résistance primaire (*de novo*). Parmi les tumeurs qui répondent au tamoxifène au début du traitement, certaines acquièrent une résistance en cours de thérapie. On parle alors de résistance acquise ou secondaire.

Les lignées de cancers du sein ER α + sont d'excellents outils permettant de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les tumeurs du sein qui répondent en premier lieu aux thérapies endocriniennes développent ensuite une résistance acquise aux anti-œstrogènes. Quatre modèles provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) ont été bien caractérisés (ZR-75, BT474, T47D et MCF-7) pour le statut de ER α , la régulation de ER α , la réponse aux hormones et aux anti-œstrogènes. Afin de mettre en évidence les propriétés de résistance acquise aux anti-œstrogènes, des populations de MCF-7, BT474, ZR-75 et T47D qui se sont adaptées à ces traitements ont été établies et caractérisées (Sweeney et al., 2012). Ces modèles sont des outils très intéressants afin de déchiffrer les mécanismes à l'origine des résistances aux traitements.

a- La signalisation des facteurs de croissance

La surexpression de HER-2 et des facteurs de croissance sont des mécanismes impliqués dans la résistance aux thérapies endocriniennes assez bien caractérisés.

La croissance tumorale du modèle cellulaire MCF-7/HER2-18, qui surexprime HER-2, est inhibée par une déprivation œstrogénique, mais stimulée par le tamoxifène, suggérant que le tamoxifène agit comme un agoniste. Indépendamment des œstrogènes, le tamoxifène induit l'activation de la signalisation EGFR/HER-2, conduisant à l'activation des voies de signalisation MAPK/AKT. Ces kinases phosphorylent et activent ER α et son co-activateur SRC-3, ce qui induit l'expression des gènes régulés par les œstrogènes. En effet, le complexe ER α /Tamoxifène recrute des co-activateurs tels que SRC-3 plutôt que des co-répresseurs dans les cellules surexprimant HER-2 (Shou et al., 2004). Ces données sont en adéquation avec les observations cliniques montrant que des tumeurs surexprimant HER-2 et SRC-3 ont un mauvais pronostic lorsqu'elles sont traitées avec le tamoxifène (Osborne et al., 2003) (**Figure 30**).

De plus, dans d'autres modèles de cellules résistantes au tamoxifène, dérivées des MCF-7, on observe une augmentation de l'expression de EGFR et HER-2, ainsi que de l'hétérodimérisation des récepteurs et de la phosphorylation des MAPK, d'AKT et de ER α nucléaire sur les sérines 118 et 167 (Hutcheson et al., 2003; Jordan et al., 2004; Knowlden et al., 2003). La croissance de ces

lignées cellulaires est d'ailleurs significativement inhibée par le traitement au Gefitinib (un inhibiteur de EGFR) ou au Trastuzumab (Gee et al., 2003; Shou et al., 2004) (**Figure 30**).

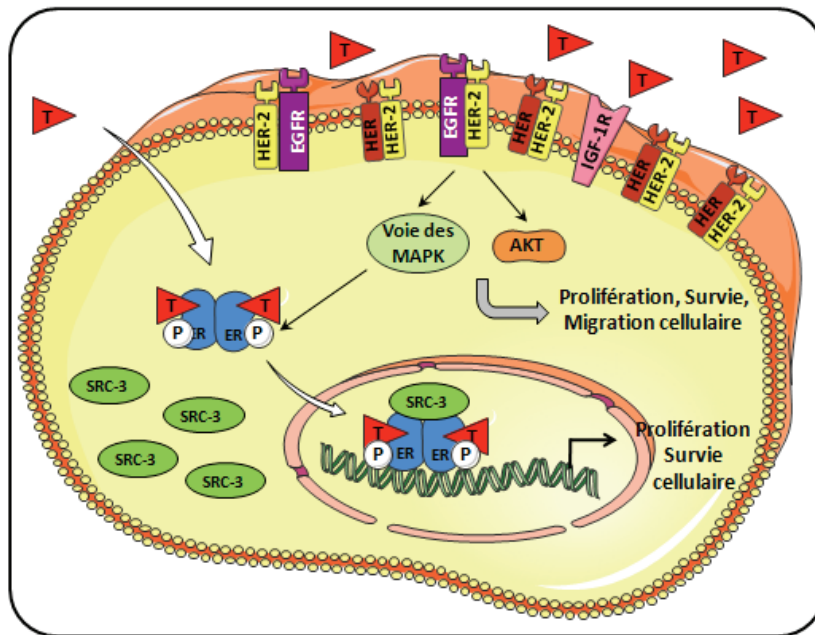


Figure 30 : Modèle d'une cellule tumorale résistante au tamoxifène dans laquelle la signalisation des facteurs de croissance est dérégulée.

L'implication de la signalisation IGF-1R dans la résistance au tamoxifène a été explorée dans des lignées cellulaires. Dans deux lignées cellulaires résistantes au tamoxifène, le récepteur IGF-1R est hyperactivé (Knowlden et al., 2005; Zhang et al., 2011b) et agit en amont de la voie EGFR activée par les œstrogènes (Santen et al., 2009). Ces études doivent être complétées par des études cliniques.

Des cellules MCF-7 ayant échappé à l'inhibition de croissance par le fulvestrant présentent une augmentation de la signalisation EGFR, suggérant que la voie de signalisation des facteurs de croissance joue également un rôle dans la résistance au fulvestrant (McClelland et al., 2001).

Deux études récentes, réalisées dans des cellules MCF-7 transfectées avec le gène de l'aromatase et exposées à long terme au letrozole ou à l'anastrozole, présentent une activation constitutive de la voie PI3K/AKT/mTor et une expression dérégulée de plusieurs récepteurs HER (Cavazzoni et al., 2012; Vilquin et al., 2013). Cette activation a été validée dans des tumeurs mammaires résistantes aux anti-aromatases. Ces deux groupes ont démontré que la voie AKT/mTor activée par les facteurs de croissance peut jouer un rôle clé dans le phénomène de résistance aux anti-aromatases et que l'utilisation d'anti-aromatases en combinaison avec des inhibiteurs de la voie AKT/mTor peut représenter une stratégie thérapeutique prometteuse.

b- Implication de ER α

i. Perte d'expression de ER α

Etant donné que l'expression de ER α est le principal marqueur prédictif de réponse à l'hormonothérapie, une perte d'expression du récepteur est un des principaux mécanismes de résistance aux agents hormonaux. Pour 17% des patientes, une perte d'expression de ER α pourrait être responsable de la résistance au tamoxifène (Kuukasjärvi et al., 1996).

(i) L'inactivation de la chromatine due à la déacétylation des histones et à la méthylation de l'ADN pourrait expliquer la perte d'expression de ER α dans les cellules de cancer du sein (Parl, 2003). Des études *in vitro* ont démontré que DNMT1 (DNA (cytosine-5) methyltransferase deacetylase 1) interagit avec HDAC, et qu'un co-traitement avec des inhibiteurs de DNMT1 et HDAC réinduirait l'expression de ER α dans les lignées de cancer du sein ER α - (Yang et al., 2001).

(ii) L'activation des voies de signalisation des facteurs de croissance peut réduire l'expression de ER α et sa fonction (Stoica et al., 2000). De plus, les niveaux d'expression de EGFR, HER-2, IGF-1R sont généralement plus élevés dans les tumeurs ER α - que dans les tumeurs ER α + (Normanno et al., 1994). Cela suggère que la signalisation des facteurs de croissance contribue à la répression transcriptionnelle de l'expression de ER α et conduit à la résistance aux traitements anti-œstrogéniques. Par ailleurs, la signalisation des facteurs de croissance étant hyperactivée dans les tumeurs résistantes, elle pourrait remplacer la voie ER α détruite.

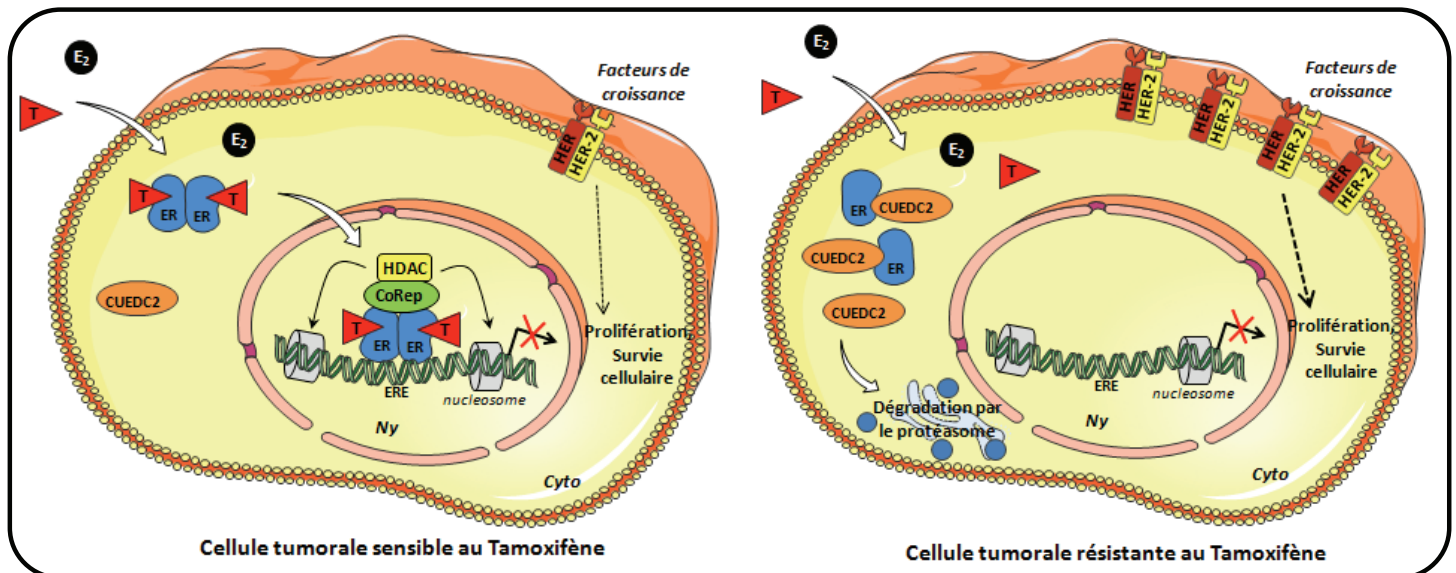


Figure 31 : CUEDC2 régule l'expression de ER α dans les cellules tumorales

En comparaison aux cellules tumorales sensibles au tamoxifène, celles qui sont résistantes présentent une diminution de la quantité de ER α et une hyperactivation de la signalisation des facteurs de croissance.

(iii) La protéine CUEDC2 (CUE domain-containing protein-2), une protéine contenant un motif de liaison à l'ubiquitine, module la stabilité de ER α *via* la voie du protéasome, ubiquitine-

dépendante. Une large cohorte de patientes atteintes de cancers du sein a permis de montrer une corrélation inverse entre CUEDC2 et l'expression de ER α . De façon très intéressante, une forte expression de CUEDC2 est corrélée à une résistance au tamoxifène, probablement due à une perte de ER α *via* la voie de dégradation du protéasome ubiquitine-dépendante (Pan et al., 2011) (**Figure 31**).

Il faut noter que l'on peut attribuer la perte d'expression de ER α à une résistance acquise. En effet, un groupe a étudié par immunohistochimie le statut ER α dans 72 biopsies prises avant le traitement et après la rechute sous tamoxifène. 89% des tumeurs étaient ER α + avant le traitement, et seulement 61% sont positives à la rechute (Johnston et al., 1995). Une autre étude à partir de puces à ADN a démontré que 17% de tumeurs ER α + devenait ER α - après rechute (Dowsett et Ellis 2003).

ii. Mutations de ER α

Des mutations de ER α peuvent être impliquées dans le mécanisme de résistance hormonale. Le groupe de Fuqua a identifié la mutation de la lysine 303 en arginine dans 20 hyperplasies canalaire sur 59 (Fuqua et al., 2000). Plus récemment, cette mutation a été retrouvée dans des tumeurs de sein invasives (Conway et al., 2007; Herynk et al., 2007) et conduirait à une hypersensibilité aux œstrogènes, une résistance au tamoxifène et aux inhibiteurs d'aromatase (Barone et al., 2010; Fuqua et al., 2000). Cette mutation conduit à une hypersensibilité de ER α qui augmente sa liaison aux coactivateurs en présence d'une faible concentration d'œstrogènes. La lysine 303 est un point chaud de modifications post-traductionnelles de ER α , on peut donc spéculer que cette mutation peut empêcher l'une de ces modifications, induisant donc une hypersensibilité de ER α (Le Romancer et al., 2011). Cependant, ce sont des événements relativement rares, qui ne peuvent pas expliquer à eux seuls les mécanismes de résistance aux thérapies endocriniennes.

iii. ER α et ses co-régulateurs

Les coactivateurs et corépresseurs ont des rôles très importants dans la régulation de l'activation transcriptionnelle de ER α . De ce fait l'altération de l'expression de ces protéines peut contribuer au phénomène de résistance au tamoxifène.

SRC-3 est un coactivateur de ER α qui est surexprimé dans plus de 50% des tumeurs du sein (Anzick et al., 1997). Un haut niveau d'expression de SRC-3 est associé à une diminution de la survie sans progression chez des patientes traitées au tamoxifène (Osborne et al., 2003). Ce résultat serait dû à l'inter-relation entre SRC-3 et HER-2, précédemment évoquée (Shou et al., 2004) (**Figure 30**). De plus, dans des cellules résistantes au létrozole, le complexe ER α /SRC-3 est recruté sur le promoteur des gènes cibles de ER α , qui sont alors constitutivement stimulés (O'Hara et al., 2012). Cela suggère qu'une forte expression de coactivateurs pourrait augmenter l'effet agoniste des thérapies endocriniennes et donc contribuer à la résistance.

Lorsque les corépresseurs se lient à ER α , ils facilitent la condensation de la chromatine et l'inhibition de la transcription génique. Les co-répresseurs sont recrutés quand un antagoniste, tel que le tamoxifène, est lié à ER α , ce qui conduit à la répression de ses activités agonistes. Le complexe N-CoR (nuclear receptor corepressor) est faiblement associé à ER α en absence de ligand, mais l'est très fortement en présence de tamoxifène (Lavinsky et al., 1998). Des cellules MCF-7 implantées dans des souris immunodéficientes, traitées au tamoxifène, ont permis de montrer que le niveau de N-CoR diminue dans les tumeurs qui développent une résistance au tamoxifène. Une diminution du niveau de N-CoR et de son activité répressive est corrélée à l'acquisition de la résistance au tamoxifène dans ces modèles de souris, et pourrait correspondre à une augmentation de l'effet agoniste du tamoxifène sur ER α .

c- Implication d'autres isoformes

i. Expression de ER β

Le rôle de ER β dans la résistance à l'hormonothérapie n'est pas complètement élucidé. Il a été montré que la liaison de ER β avec des anti-œstrogènes, tels que le tamoxifène, active les gènes régulés par AP-1 (Paech et al., 1997), changeant ainsi la balance de coactivateurs et de co-répresseurs qui lui sont associés (Kushner et al., 2000). Une étude par RT-PCR a montré que le niveau des transcrits de ER β est augmenté chez les patientes résistantes au tamoxifène par rapport aux autres (Speirs et al., 1999). Cependant d'autres études sont nécessaires afin de conclure sur le rôle de ER β dans la résistance aux thérapies endocriniennes.

ii. Expression de ER α 36

Du fait de la capacité de ER α 36 à induire les voies de signalisation non génomiques, son rôle dans la résistance des cancers du sein aux thérapies endocriniennes a été étudié. Lorsque l'on traite au tamoxifène des cellules MCF-7 transfectées avec ER α 36, une brève phosphorylation de ERK1/2 et AKT est détectée. Cependant, dans les cellules MCF-7 ER α 66+ et ER α 36-, la phosphorylation induite par le tamoxifène est abrogée. Le tamoxifène peut donc activer les voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/AKT, responsables de la prolifération cellulaire et de la survie. Cela suggère que l'activité non génomique médiée par ER α 36 est impliquée dans la résistance au tamoxifène. Dans les cellules ER α 36+, le tamoxifène agirait non pas comme une drogue mais comme un agoniste de ER α 36 (Lee et al., 2008; Wang et al., 2006). Une étude clinique a démontré que les tumeurs de patientes exprimant ER α 66, ainsi qu'un fort niveau de ER36, ont un bénéfice moindre à recevoir du tamoxifène (Shi et al., 2009).

d- Hypersensibilité aux œstrogènes

Différentes données suggèrent que l'un des mécanismes de la résistance aux thérapies endocriniennes serait l'acquisition par les cellules tumorales d'une hypersensibilité aux

œstrogènes. Ce phénomène d'hypersensibilité aux œstrogènes est dû à l'adaptation à la déprivation aux œstrogènes et serait impliqué dans la résistance aux anti-aromatases.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, de nombreuses données indiquent une interrelation entre la voie de signalisation des facteurs de croissance et de ER α au moment de la rechute (Arpino et al., 2008). ER α pourrait aussi être activé par les facteurs de croissance et deviendrait hypersensible à différentes kinases intracellulaires, incluant les voies de signalisation MAPK, IGF1, AKT (Campbell et al., 2001; Jeng et al., 2000; Stephen et al., 2001). Des concepts similaires émergent *in vivo*, validant ces données *in vitro*. Les cellules LTED (pour « long term œstrogen deprivation »), établies à partir des cellules MCF-7, qui surexpriment le gène de l'aromatase ont été injectées à des souris nues athymiques ovariectomisées. Les tumeurs qui deviennent résistantes au letrozole présentent une augmentation de HER-2, IGF-1R et des voies de signalisation *en aval* (MAPK) (Brodie et al., 2011, 2010). Les protéines impliquées dans les voies de signalisation MAPK (p-Raf, p-Mek1/2, p-MAPK) sont augmentées *in vivo* dans les tumeurs qui ont acquis une résistance au letrozole, suggérant l'activation d'une signalisation aberrante. Les cellules isolées de ces tumeurs présentent un niveau d'expression de HER-2 augmenté, une plus faible expression de ER α et une croissance œstrogéno-indépendante. Quand l'expression de HER-2 est inhibée par le trastuzumab, le niveau d'expression de ER α augmente confirmant là encore que HER-2 régule négativement ER α . De ce fait, l'inhibition des deux voies de signalisation (ER α et HER-2) est nécessaire pour prolonger la réponse tumorale aux thérapies endocriniennes (Brodie et al., 2010).

e- Mécanismes pharmacogénomiques

Le tamoxifène est métabolisé par le foie en 4-hydroxytamoxifène par le cytochrome p450 de type CYP2D6. Le métabolite actif qui en résulte est l'endoxifène (Johnson et al., 2004) (**Figure 32**). Ce métabolisme a été identifié chez des patientes recevant un traitement adjuvant au tamoxifène (Stearns et al., 2003). Approximativement 8% des femmes caucasiennes portent des allèles inactifs du cytochrome p450 2D6 (CYP2D6), ce qui empêche la transformation du tamoxifène en son métabolite actif. Les patientes présentant une activité réduite du CYP2D6, en raison de leur génotype, produisent peu d'endoxifène, et de ce fait répondent moins bien au tamoxifène (Hoskins et al., 2009). On parle de mécanisme de résistance primaire au tamoxifène.

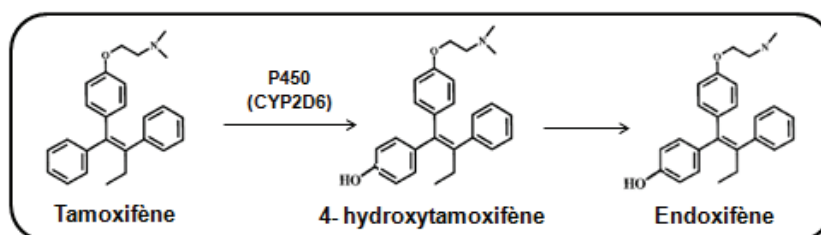


Figure 32 : Conversion du Tamoxifène en métabolite actif

A la vue de ces différents mécanismes, il semble évident que la résistance endocrinienne est multifactorielle. Cependant la signalisation des facteurs de croissance prend une part extrêmement importante dans ces mécanismes.

2. Résistance aux inhibiteurs de mTor

Les rapalogues sont des molécules qui inhibent spécifiquement mTor1 (**Figure 28**). Des phénomènes de résistance apparaissent et peuvent être expliqués par différents mécanismes.

Bien que les rapalogues inhibent la phosphorylation de S6K1, ils ne bloquent pas la phosphorylation de 4E-BP1 et la traduction cap-dépendante (Choo et al., 2008). De ce fait, les rapalogues inhibent de façon incomplète la synthèse protéique mTORC1-dépendante, ce qui pourrait contribuer à la résistance à ces drogues.

Une autre raison qui explique la résistance aux rapalogues est l'existence de multiples rétro-contrôles dans la voie de signalisation de mTor, qui limitent la signalisation mTorc1 et 2. Ces rétro-contrôles étant bloqués, un mécanisme de résistance se met en place (**Figure 28**).

- (i) mTorc1 active S6K1, qui en retour provoque la protéolyse de IRS1. Les rapalogues bloquent cette auto-inhibition de la voie, causant ainsi une activation en retour de PI3K, qui va alors activer mTorc1 (Harrington et al., 2004).
- (ii) mTorc1, *via* S6K1, induit la phosphorylation de Rictor afin d'inhiber mTorc2 (Dibble et al., 2009). Les rapalogues, en inhibant mTorc1, lèvent cette inhibition et induisent l'activation d'AKT par mTorc2.
- (iii) L'inhibition de mTorc1 induit une activation en retour de MAPK *via* la voie S6K1/PI3K. L'activation des MAPK a été observée dans des tumeurs solides métastatiques après un traitement par éverolimus (Carracedo et al., 2008).

De ce fait, les inhibiteurs de mTor de deuxième et troisième génération sont des alternatives possibles à ces rétro-contrôles. En effet, ceux de seconde génération inhibent à la fois mTorc1 et mTorc2, et ceux de troisième génération sont une combinaison des inhibiteurs de mTorc1/2 et de PI3K.

3. Résistance au Trastuzumab

Le trastuzumab est la principale thérapie ciblée anti-HER-2. Depuis sa découverte, cette molécule a significativement augmenté le pronostic des patientes atteintes de cancers du sein. Cependant sa durée de réponse reste modeste et de nombreux mécanismes de résistance se mettent en place. Ceci est dû à des mécanismes primaires ou secondaires de résistance aux traitements (**Figure 33**).

a- Problèmes stériques

i. p95HER-2

Il existe un sous-groupe de tumeurs surexprimant un récepteur HER-2 muté. Cet isoforme, appelé p95HER-2, est un récepteur HER-2 tronqué par protéolyse dans sa partie N-terminale. p95HER-2 ne peut plus lier le trastuzumab et il est constitutivement activé (Scott et al., 1993) (**Figure 33A**). La surexpression de p95HER-2 est retrouvée dans plus de 30% des cancers du sein HER-2+. Elle est associée à une réduction de la survie sans progression (Sáez et al., 2006). De plus, les patientes atteintes de cancer du sein métastatique, porteuses de la mutation p95HER-2 sont moins susceptibles de répondre au trastuzumab que celles qui ont un récepteur HER-2 non muté (Scaltriti et al., 2007). Cependant le mécanisme induisant la protéolyse de HER-2 en réponse au trastuzumab n'est pas connu. Les lignées cellulaires exprimant p95HER-2 et les modèles de xénogreffes exprimant p95HER-2 sont résistantes au trastuzumab mais restent sensibles à l'inhibiteur de kinases HER-2, le lapatinib, avec une réduction de la phosphorylation de p95HER-2, de la phosphorylation *en aval* d'AKT et de la croissance cellulaire (Scaltriti et al., 2007). Des études complémentaires devraient permettre de confirmer l'utilisation de p95HER-2 comme un biomarqueur de résistance au trastuzumab.

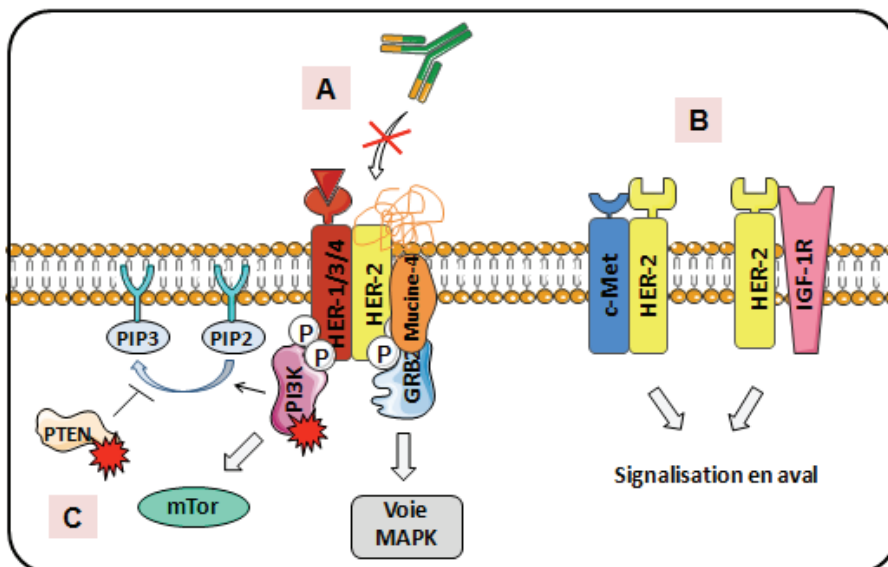


Figure 33 : Les mécanismes de résistance au Trastuzumab

A : Une forme tronquée de HER-2 (p95HER-2) ou l'association de HER-2 avec sa protéine partenaire, la Mucine-4, empêche la liaison du Trastuzumab et stimule donc la signalisation en aval. **B :** Une augmentation des autres récepteurs aux facteurs de croissance, tel que c-Met ou IGF-1R, peut induire les voies de signalisation MAPK/AKT. **C :** Des altérations intracellulaires, peuvent conduire aux mécanismes de résistance au Trastuzumab.

ii. Mucin-4

Un autre mécanisme à l'origine de la résistance des tumeurs au Trastuzumab serait lié à la protéine Mucin-4. Mucin-4 est une protéine membranaire très O-glycosylée, partenaire de HER-

2. Son expression est corrélée à un mauvais pronostic dans les tumeurs mammaires. Une forte expression de Mucin-4 masquerait le site de liaison à HER-2 (**Figure 33A**). Cependant le mécanisme à l'origine de la surexpression de Mucin-4 dans les cellules résistantes au Trastuzumab n'est pas connu (Nagy et al., 2005).

b- Surexpression de récepteurs à tyrosine kinases

i. c-Met

c-Met est un oncogène qui code pour un récepteur à tyrosine kinase composé d'une chaîne disulfide α liée à une sous-unité β . Ce récepteur est connu pour avoir seulement un ligand connu, HGF (hepatocyte growth factor). Il est exprimé dans les cellules épithéliales (Bottaro et al., 1991). c-Met et HGF sont surexprimés respectivement dans les tumeurs du sein et dans le stroma tumoral. De plus, c-Met est surexprimé dans 25% des tumeurs HER-2+. Une étude a montré que c-Met et HER-2 sont capables d'interagir ensemble (Agarwal et al., 2009), suggérant que c-Met peut intervenir dans la signalisation HER-2 pour induire une résistance au Trastuzumab (**Figure 33B**). Dans ce sens, une étude *in vitro* a mis en évidence qu'une déplétion de c-Met rend les cellules plus sensibles au Trastuzumab et que cette drogue conduit à une surexpression de c-Met (Shattuck et al., 2008). Toutes ces données indiquent que la surexpression de c-Met est impliquée dans la résistance acquise au Trastuzumab.

ii. IGF-1R

L'IGF-1R pourrait être impliqué dans le mécanisme de résistance au Trastuzumab. Une surexpression d'IGF-1R rend des cellules SKBR3, sensibles au Trastuzumab, résistantes à la thérapie (Lu et al., 2001). Ceci serait dû à une interrelation entre HER-2 et IGF-1R, dans laquelle la stimulation de IGF-1R induirait la phosphorylation de HER-2 et l'activation de PI3K (**Figure 33B**). En outre, la signalisation de IGF-1R bloque la phosphorylation de HER-2 et restaure la sensibilité au Trastuzumab dans des modèles cellulaires (Nahta et al., 2005). L'analyse d'échantillons de tumeurs primaires provenant d'une étude adjuvante au Trastuzumab a montré que la présence d'IGF-1R sur la membrane était associée à une plus faible réponse au Trastuzumab.

c- Altérations intracellulaires

Des altérations géniques peuvent aussi être à l'origine de la résistance au Trastuzumab. L'activation constitutive de PI3K a lieu selon deux mécanismes principaux : (i) une perte de fonction de PTEN (phosphate and tensin homolog) *via* des mécanismes de mutations inactivatrices ou de mécanismes conduisant à une sous-expression protéique et (ii) des mutations activatrices dans le gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3K (PI3KCA) (Hennessy et al., 2005) (**Figure 33C**). Une perte de PTEN a été relevée dans 36% de tumeurs primaires de sein HER-2+ ayant rechuté sous forme métastatique. De plus, les patientes avec

des tumeurs déficientes pour PTEN ont un taux de réponse au Trastuzumab plus faible que les patientes exprimant PTEN sauvage (Nagata et al., 2004). Une cohorte de 55 patientes résistantes au Trastuzumab a permis de montrer que 25% d'entre elles présentent une mutation activatrice de PI3KCA et que 20 à 25% ont une perte de PTEN (Berns et al., 2007). Les patientes traitées au Trastuzumab avec des mutations activatrices de PI3KCA ont une survie sans progression plus courte que celles sans mutations. Les lignées cellulaires de sein HER-2+ avec des mutations activatrices de PI3KCA (E545K et H1047R) sont plus résistantes au Trastuzumab que les lignées cellulaires ne possédant pas de mutation (Kataoka et al., 2010). Ces études suggèrent que lorsque la voie PI3K/AKT est constitutivement activée, du fait d'une perte de PTEN ou d'une mutation activatrice de PI3KCA, une résistance au Trastuzumab se développe.

Le groupe de D. Yu a montré que Src est activée dans les lignées cellulaires de cancer du sein résistantes au Trastuzumab. Plus précisément, les patientes qui ont la protéine Src activée répondent moins au Trastuzumab que celles dont Src n'est pas activé. D'un point de vue moléculaire, ces auteurs ont montré que Src est le médiateur central des voies de résistance, ce qui fait de Src une cible thérapeutique prometteuse et globale de la résistance au Trastuzumab. L'inhibition de Src, *in vitro* et *in vivo*, bloquerait efficacement la phosphorylation d'AKT et la signalisation *en aval* de EGFR, même dans les cellules déficientes pour PTEN (Zhang et al., 2011b).

Deux thérapies ciblées majeures sont développées dans les cancers du sein, l'hormonothérapie pour les tumeurs ER α + et les thérapies ciblant HER-2 pour les tumeurs surexprimant HER-2. Cependant, quels que soit les traitements, les cellules cancéreuses mettent en place de nombreux mécanismes de résistance, qu'il est important de mieux appréhender.

Chapitre 4 : La méthylation sur arginine

Au cours des dernières années, la découverte de la méthylation sur résidus lysines et arginines a ajouté une nouvelle dimension au domaine de la transduction du signal. Dans cette partie nous détaillerons plus précisément la méthylation sur arginine, dont l'étude de sa régulation a fait partie intégrante de mon travail de thèse.

I- Généralités

Il y a de cela 54 ans, un résidu lysine méthylé (ϵ -N-methyl-lysine) sur la protéine de flagelle de *Salmonella typhimurium* a été identifié (Ambler et al., 1959). Cinq ans plus tard, la méthylation des lysines d'histones a été décrite (Murray et al., 1964). Cette modification résulte du transfert d'un groupement méthyle à partir d'un donneur de méthyle appelé S-adenosyl-L-méthionine (SAM) (Kim et al., 1965). En 1965, pour la première fois, il est question de mono et diméthylation sur lysine, suivi en 1967 de la découverte de la triméthylation sur lysine (Hempel et al., 1968). Il a alors été clairement établi que l'addition d'un ou plusieurs groupements méthyles sur l' ϵ -amine d'un résidu lysine pouvait conduire à la formation d'une lysine mono-, di- ou tri-méthylée (**Figure 34**).

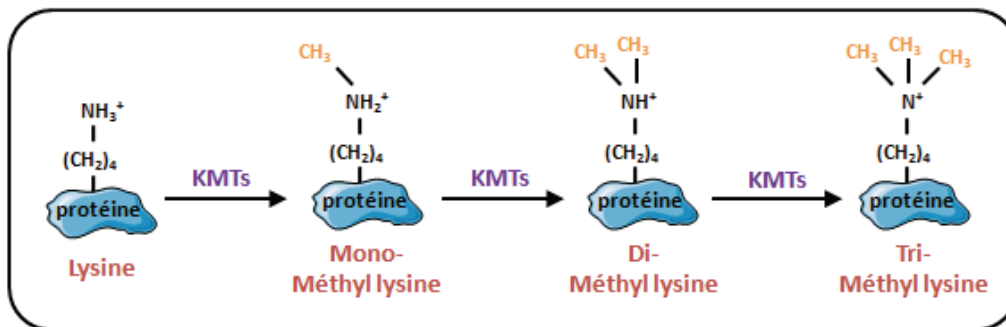


Figure 34 : Le processus de méthylation sur lysine

Les KMT (lysines méthyltransférases) conduisant à une mono-, di- ou tri-méthylation sur lysine.

La première enzyme impliquée dans le processus a alors été identifiée, la « protein methylase I » (Paik and Kim, 1968). Il s'est ensuite avéré que cette méthyltransférase était une arginine méthyltransférase et non une lysine méthyltransférase. A la suite de cela, trois laboratoires ont mis en évidence la méthylation sur arginine et démontré que l'addition d'un ou plusieurs groupes méthyles sur l'atome guanidino-nitrogène de l'arginine résultent en la formation d'une arginine N^G-monométhylée (MMA) ou N^GN^G-diméthylée (symétriquement (sDMA) ou asymétriquement (aDMA)) (Baldwin et al., 1971; Brostoff et al., 1971; Kakimoto et al., 1970).

Concernant la méthylation sur lysine, deux classes d'enzymes sont décrites, la famille contenant un domaine SET et celle n'en contenant pas (Dot1/Dot1L) (pour revue (Cheng et al., 2007a)).

Pendant plusieurs années, de nombreuses études ont cherché à élucider le rôle de la méthylation sur les histones, ainsi que la caractérisation des méthyltransférases. Il est maintenant bien établi que sur les histones H3 et H4, au moins cinq résidus arginines (H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 et H4R3) et six lysines (H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 et H3K20) sont méthylés. Suivant le site, la méthylation des histones, de la même façon que l'acétylation ou la phosphorylation, régule positivement ou négativement la transcription (pour revue (Zhang et al., 2001)) (**Figure 35**). Il faut noter que l'histone H2 est elle aussi modifiée.

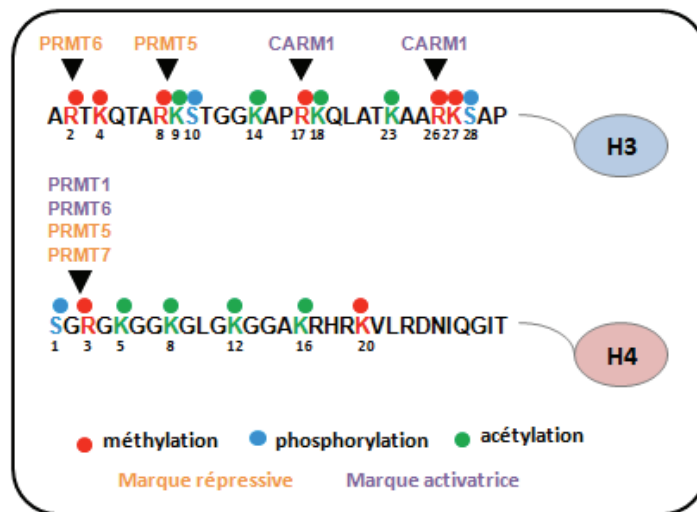


Figure 35 : Les PTM affectant les histones H3 et H4.

L'extrémité N-terminale des histones H3 et H4 subit différents types de PTM. Les enzymes responsables de la méthylation sur arginine des histones sont annotées, et leur activité activatrice (orange) ou répressive (violet) est indiquée. Adapté de (Di Lorenzo et al., 2011; Zhang et al., 2001)

II- Le processus de méthylation sur arginine

1. Les enzymes

a- La famille des PRMT (proteine arginine méthyltransferase)

Il a été prédit que plus de 1% des gènes du génome des mammifères codent pour des méthyltransférases (Katz et al., 2003). Actuellement, onze arginine méthyltransférases ont été identifiées. Elles catalysent le transfert d'un groupement méthyl d'un S-adenosylmethionine (AdoMet) à un atome guanidino-nitrogène, résultant en un S-adenosylhomocystéine (AdoHcy) et une arginine méthylée. Les PRMTs sont classées en deux types d'enzymes (type I et II). Les

deux types catalysent la formation d'une arginine monométhylée (MMA). Les PRMTs de type I (PRMT1, PRMT2, PRMT3, Carm1, PRMT6 et PRMT8) mènent à la production d'arginines diméthylées asymétriquement (ADMA) c'est-à-dire que le groupement méthyle est placé sur le même atome nitrogène du groupement guanidino. Les PRMTs de type II (PRMT5, PRMT7 et PRMT9) catalysent la formation d'arginines diméthylées symétriquement (SDMA), le groupement méthyle est alors placé sur chaque atome guanidino-nitrogène de l'arginine (**Figure 36**) (Bedford et al., 2007).

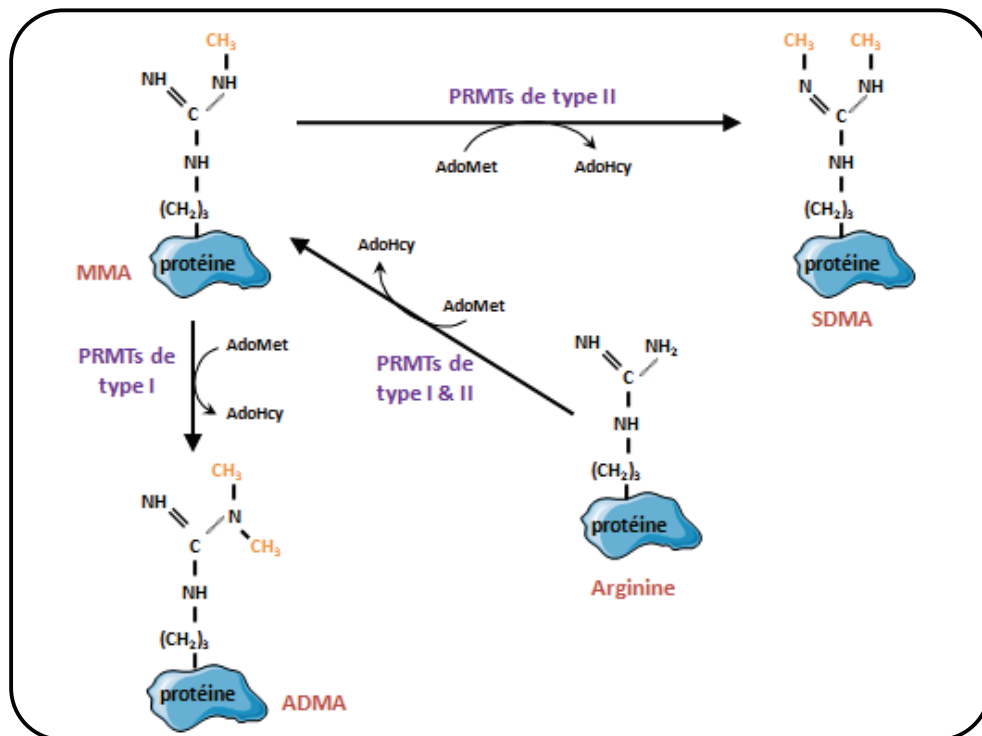


Figure 36 : Le processus de méthylation sur arginine

Les protéines peuvent être mono-méthylées sur arginine (MMA) par des PRMTs de type I ou II. Les PRMTs de type I induisent la production de résidus arginines diméthylés asymétriquement (ADMA). Les PRMTs de type II induisent la production de résidus arginines diméthylés symétriquement (SDMA).

PRMT1 a été identifiée par une similarité de séquence avec l'arginine méthyltransférase de la levure Hmt1/Rmt1 (Lin et al., 1996). Elle a été identifiée pour la première fois en double hybride comme partenaire du récepteur à l'interféron (Abramovich et al., 1997). PRMT1 est la PRMT majoritaire des cellules de mammifères puisqu'elle méthyle plus de 90% des résidus méthylés sur arginine (Tang et al., 2000). Elle est exprimée dans le cytoplasme et le noyau et a des substrats dans les deux compartiments (Herrmann et al., 2005). PRMT1 méthyle entre autre de nombreuses hnRNPs (heterogenous ribonucleoprotein particule), impliquées dans la régulation de la transcription, le trafic des ARNs et des protéines et la transduction du signal. La méthylation des hnRNPs leur permet de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau (Herrmann et al., 2004). PRMT1 contribue au code histone puisqu'elle est capable de méthyle l'arginine 3 de l'histone H4, une marque d'activation transcriptionnelle (Wang et al., 2001b). De

plus, PRMT1 est un coactif transcriptionnel, recruté sur le promoteur de plusieurs facteurs de transcription (Bedford et al., 2005). Les souris knock out (KO) pour PRMT1 meurent à approximativement 6,5 jours après implantation, montrant un rôle primordial de l'enzyme dans le développement embryonnaire (Pawlak et al., 2000). La plupart des substrats de PRMT1 possède un motif GAR (glycine arginine-rich) (Zhang et al., 2003).

La seconde PRMT à avoir été identifiée est PRMT2 (Katsanis et al., 1997). PRMT2 possède un domaine SH3 en N-terminal et fonctionne comme un coactivateur de ER α (Qi et al., 2002). Il était initialement admis que PRMT2 n'avait pas d'activité méthyltransférase. Cependant, plus récemment, une faible activité de type I a été mise en évidence. PRMT2 peut méthyler l'histone H4, bien que le site de méthylation n'ait pas été identifié (Lakowski et al., 2009). Le domaine SH3 en N-terminal de la protéine permet de lier le domaine N-terminal de PRMT8 (Sayegh et al., 2007).

PRMT3 est la seule PRMT ayant un domaine en doigt de zinc en N-terminal, qui est son module de reconnaissance du substrat (Tang et al., 1998). La protéine S2 ribosomale 40S (rpS2) est l'un de ces substrats *in vitro* et *in vivo* (Swiercz et al., 2005, 2007). PRMT3 serait uniquement localisée dans le cytoplasme des cellules, et ne pourrait donc pas agir sur les voies épigénétiques.

CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1), aussi connue sous le nom de PRMT4, a été identifiée en double hybride comme étant une protéine associée au coactivateur SRC-1 (Chen et al., 1999c). Le recrutement de CARM1 sur les promoteurs résulte en la méthylation de l'histone H3 (H3R17me₂ asymétrique et H3R26me₂ asymétrique) et des corégulateurs (Bedford et al., 2005). De plus, CARM1 méthyle les facteurs d'épissage et régule le couplage transcription/épissage (Cheng et al., 2007b). Une étude a d'ailleurs montré que CARM1 est capable de s'autométhyle afin de coupler transcription et épissage de l'ARNm (Kuhn et al. 2011). Les souris KO pour CARM1 sont plus petites que les sauvages et meurent juste après la naissance (Yadav et al., 2003). On peut attribuer cette létalité au fait que CARM1, comme PRMT1, méthyle de nombreux substrats et est impliqué dans de nombreux processus biologiques.

La protéine PRMT5 a été clonée comme étant une protéine de liaison à Jak2 qui méthyle les histones H2A, H3 et H4 (Branscombe et al., 2001; Pollack et al., 1999). Au niveau de l'hétérochromatine, la méthylation symétrique de H4R3 par PRMT5 conduit à une répression de la transcription de gènes (Branscombe et al., 2001; Pollack et al., 1999). La protéine réalise des méthylations symétriques sur résidus arginines dans des motifs GAR ou PGM (proline-, glycine-, methionine-, arginine-rich) (Branscombe et al., 2001). PRMT5 se localise dans le cytoplasme et le noyau. Dans le cytoplasme, PRMT5 est retrouvée dans une structure appelée le "methylosome", où elle méthyle les protéines Sm impliquées dans la biogenèse des snRNP

(Friesen et al., 2001). Dans le noyau, la protéine PRMT5 forme aussi des complexes avec la protéine de remodelage de la chromatine SWI/SNF, responsable de la méthylation de l'arginine 8 sur l'histone H3, une marque répressive de la transcription (Pal et al., 2004). PRMT5 joue aussi un rôle dans différents processus tels que la biogenèse des ribosomes ou la différenciation musculaire (Ren et al., 2010; Dacwag et al., 2009).

PRMT6 est seulement exprimée dans le noyau et a la capacité de s'autométhyliser (Frankel et al., 2002). Comme PRMT1, PRMT6 méthyle préférentiellement un motif GAR. Un des substrats de PRMT6 est la polymérase β qui stimule l'activité ADN polymérase (El-Andaloussi et al., 2006). De plus, PRMT6 est impliquée dans la régulation épigénétique. En effet, PRMT6 est l'enzyme principale méthylant H3R2, une marque répressive de la transcription (Hyllus et al., 2007). Cependant, PRMT6 peut aussi fonctionner comme un coactivateur (Harrison et al., 2010). Cela pourrait être lié à sa capacité à méthyliser l'histone H4R3 (Hyllus et al., 2007). En résumé, suivant le contexte, la méthylation de PRMT6 pourrait activer ou réprimer la transcription.

PRMT7 a été identifiée par criblage génétique comme un élément conférant une résistance à l'inhibiteur de la topoisomérase II (Gros et al., 2003). PRMT7 est une enzyme capable de catalyser la formation d'arginine diméthylée symétriquement (Lee et al., 2005b). Elle dispose de deux motifs de liaison de l'adénosylméthionine (Miranda et al., 2004).

PRMT8 a été identifiée de part sa grande homologie avec PRMT1 (Lee et al., 2005a). Son expression semble limitée au cerveau, et plus spécifiquement aux neurones. PRMT8 a un domaine N-terminal unique qui possède un motif de myristoylation lui facilitant son ancrage à la membrane plasmique. La région N-terminale de PRMT8 contient deux séquences riches en proline qui peuvent lier différents domaines SH3, dont PRMT2 (Sayegh et al., 2007). L'activité de l'enzyme recombinante est faible, cependant la délétion du domaine N-terminal résulte en une augmentation de son activité sur un substrat artificiel (Sayegh et al., 2007).

PRMT9 a été identifiée plus récemment comme étant une arginine méthyltransférase diméthylant symétriquement (Cook et al., 2006). PRMT9 est structurellement un peu différente des autres PRMTs. Elle possède un domaine en doigt de zinc en C-terminal et un domaine F-box, qui favorise les interactions protéiques. Cependant, aucune activité enzymatique n'a été identifiée (Fielenbach et al., 2007). Certaines études nomment cette enzyme FBXO11, et son gène se localise au locus 2p16.3.

PRMT10 a été identifiée en même temps que PRMT8 (Lee et al., 2005a). Elle dispose, comme PRMT7, de deux motifs putatifs de liaison de l'adénosylméthionine. De plus, elle possède un domaine TPR (« tetratricopeptide repeat »). Ces domaines sont décrits pour être des modules

d'interaction protéique. Cependant, il semblerait que cette protéine ne dispose pas d'activité enzymatique (Krause et al., 2007). Le gène codant pour PRMT10 est localisée au locus 4q31.

PRMT11, ou plutôt FBXO10, a été identifiée lors d'une recherche d'homologie avec PRMT9/FBXO11. Puisque FBXO10 a été identifié comme une méthyltransférase, Krause et al. prédisent que FBXO10 pourrait en être une aussi. Cependant, aucune démonstration de son activité méthyltransférase n'a été faite (Krause et al., 2007).

b- Spécificité de substrats

Il a été identifié que les protéines disposant d'un motif GAR sont des cibles des PRMTs (Najbauer et al., 1993). Les enzymes PRMT1, PRMT3 et PRMT6 (de type I) reconnaissent généralement des substrats contenant des motifs GAR, avec une préférence pour les répétitions RGG, tandis que CARM1 dispose d'un fort degré de spécificité et ne méthyle pas les motifs GAR. Les enzymes de type II (PRMT5 et PRMT7) méthylent des résidus arginines isolés ainsi que des arginines dans des motifs GAR. De plus, CARM1 et PRMT5 sont aussi capables de méthyle des motifs PGM qui sont retrouvés dans de nombreux facteurs d'épissage (Cheng et al., 2007b).

La méthylation sur arginine facilite l'interaction des motifs GAR et PGM méthylés avec les domaines Tudor (TDRDs). Actuellement, seuls les domaines Tudor sont décrits pour lier les arginines méthylées. Le génome des mammifères code pour plus de 30 protéines contenant des domaines tudor, et ces molécules sont impliquées dans différentes activités cellulaires (pour revue (Chen et al., 2011)). Les domaines Tudor peuvent être divisés en deux classes, ceux qui lient les arginines méthylées et ceux liant des lysines méthylées. Des études structurales ont révélé que les cages aromatiques des domaines Tudor liant les arginines méthylées sont plus étroites que celles liant les lysines méthylées, et qu'elles permettent la reconnaissance de l'arginine diméthylée par stabilisation électrostatique *via* des interactions cationiques (Liu et al., 2012a; Tripsianes et al., 2011).

c- Structures

L'activité méthyltransférase se situe dans une région très conservée d'environ 310 acides aminés, qui correspond à la région catalytique. La partie N-terminale de la région catalytique contient un pli Rossmann et deux hélices alpha. C'est la partie la plus conservée des PRMTs, qui contient le domaine de liaison de l'adénosylméthionine. La partie C-terminale de la région catalytique forme une structure de type baril, unique à la famille PRMT, qui se plie contre la région N-terminale de cette même région catalytique. Cela crée une fente qui donne un site de liaison au substrat et le site catalytique. L'analyse de la structure en trois dimensions révèle aussi une interface de dimérisation qui est essentielle à l'activité enzymatique. De ce fait, la formation de dimères emprisonne les sites actifs dans un trou entre les deux monomères. Il a

d'ailleurs été montré qu'une délétion du bras dimérique de PRMT1 élimine son activité enzymatique (Zhang et al., 2003). La dimérisation pourrait contribuer à la formation d'arginines diméthylées en facilitant le transfert d'un substrat monométhylé du site actif d'un monomère directement dans le site actif du second monomère, ajoutant ainsi un second groupe méthyle sans dissociation du substrat protéique de l'enzyme dimérique. Certaines PRMTs ont aussi la capacité de former des agrégats homomériques. PRMT1 forme des hexamères en solution (Tang et al., 1998) et PRMT5 forme des homooligomères de plus de deux sous-unités (Rho et al., 2001).

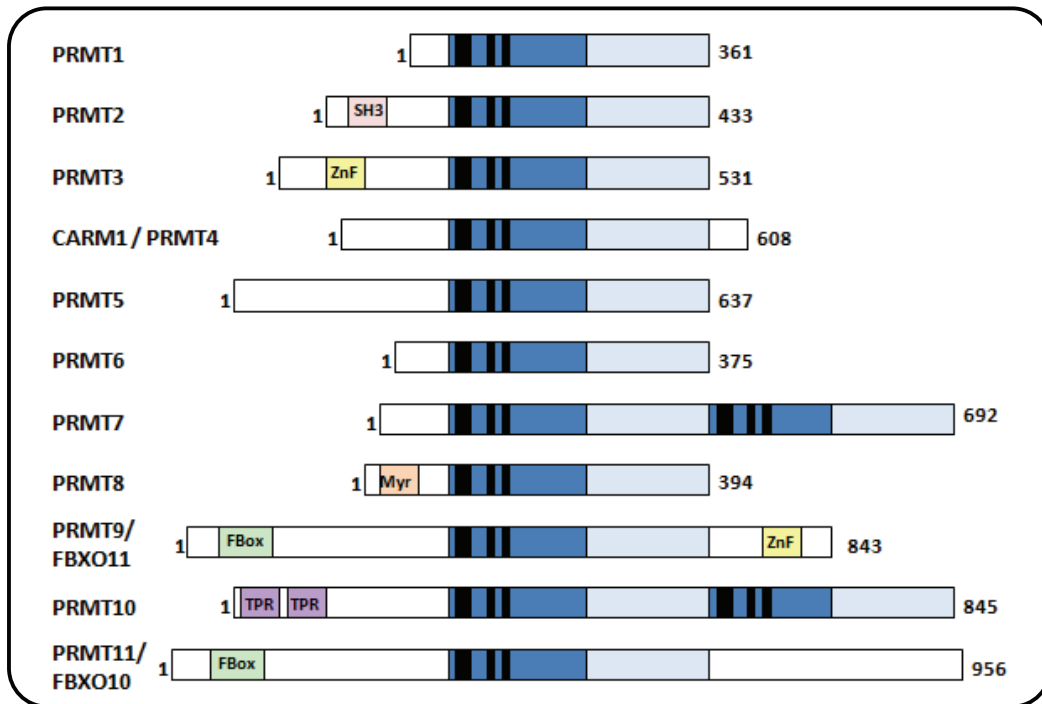


Figure 37 : Les 11 membres de la famille des PRMTs.

Le domaine catalytique méthyltransférase (bleus clair et foncé) contient une série de motifs très conservés (noir) qui sont importants pour la liaison du donneur de méthyle et pour la catalyse. Motifs additionnels : domaine SH3 (SH3), domaine en doigt de zinc (ZnF), motif de myristoylation (Myr), motif FBox, motif tétratricopeptide repeat (TPR).

En plus de ce domaine, chaque PRMTs dispose de domaines N-terminal et C-terminal qui leur sont propres (**Figure 37**). Cependant, la fonction précise des régions N et C-terminales des PRMTs n'est pas claire. Certaines études, après délétion de ces domaines, ont donné quelques indices sur leurs fonctions. Pour n'en donner que quelques exemples, la délétion de la partie N-terminale de Hmt1, l'homologue de PRMT1 chez la levure, empêche la stabilité de l'hexamère et diminue l'activité méthyltransférase, suggérant que la formation de multimères contribue à l'activité enzymatique (Weiss et al., 2000). La délétion de la partie N-terminale de PRMT3, qui contient le motif en doigt de zinc altère son activité enzymatique et la spécificité du substrat, suggérant un rôle de ce domaine dans la reconnaissance du substrat (Frankel et al., 2000; Tang et al., 1998). Le domaine C-terminal, unique de CARM1, a une forte activité transcriptionnelle autonome. Ce domaine, ainsi que l'activité méthyltransférase, est requis pour la fonction de

coactivateur transcriptionnel de CARM1. Le domaine C-terminal permettrait d'interagir avec d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle (Teyssier et al., 2002).

2. PRMTs et cancer

Les PRMTs sont des enzymes ubiquitairement exprimées, qui régulent de nombreux processus cellulaires affectant ainsi la croissance, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire. Une dérégulation de ces enzymes pourrait être impliquée dans différentes pathologies, dont le cancer. Des études récentes par des approches de puces à ADN et PCR-quantitatives ont décrit l'expression aberrante d'arginine méthyltransférases dans les cancers du sein œstrogéno-dépendants. PRMT1 et FBXO11 ont par exemple été trouvés surexprimés dans des adénocarcinomes de hauts grades (Miller et al., 2005; van 't Veer et al., 2002), tandis que les protéines PRMT2, 5 et 10 ont été trouvées sous-exprimées dans des carcinomes mammaires (Finak et al., 2008; Richardson et al., 2006).

PRMT1.

Goulet et al. ont montré qu'il existait sept isoformes de PRMT1 résultant d'un épissage alternatif, qui sont tous enzymatiquement actifs, mais qui diffèrent par leurs régions N-terminales hydrophobes. Le profil d'expression des variants d'épissage de PRMT1 est altéré dans les cancers du sein. Par ailleurs, cette étude montre que l'expression de PRMT1 est augmentée dans les tumeurs de sein en comparaison avec le tissu normal mammaire adjacent (Goulet et al., 2007). Une étude plus précise de l'isoforme v2 de PRMT1 a montré que cet isoforme, principalement cytoplasmique, est surexprimé dans les lignées cellulaires de cancer du sein et dans les tumeurs. De plus, PRMT1v2 a un rôle important dans la survie cellulaire et l'invasion, et ce rôle est indissociable de sa localisation et de son activité enzymatique (Baldwin et al., 2012).

Une surexpression de PRMT1 a été observée dans de nombreux cancers humains (Yoshimatsu et al., 2011), de même qu'une forte expression des messagers dans des tumeurs de hauts grades (Miller et al., 2005). Son activité méthyltransférase est associée à la régulation de différents processus tels que la régulation des voies de signalisation non génomiques. Ces mécanismes peuvent être trouvés dérégulés dans des cas de cancers du sein du fait d'une surexpression de PRMT1 :

(i) Nous avons précédemment décrit que PRMT1 méthyle ER α , ce qui est le prérequis au recrutement du complexe mER α /PI3K/Src et à l'activation des voies de signalisation AKT dépendante *en aval*. Une hyperméthylation de ER α a été retrouvée dans 50% des tumeurs mammaires suggérant l'hyperactivation de cette voie de signalisation, ce qui induit prolifération et survie cellulaire (Le Romancer et al., 2008, 2010).

(ii) La méthylation par PRMT1 peut réguler la voie de signalisation AKT plus directement en bloquant les sites de phosphorylation d'AKT (**Figure 38**).

✓ FOXO (Forkhead box O) est un facteur de transcription qui régule la survie cellulaire. Il est négativement régulé par la voie PI3K/AKT. La phosphorylation de FOXO par AKT induit une localisation cytoplasmique du facteur de transcription et sa dégradation par le protéasome. Lorsque FOXO1 est méthylée par PRMT1 sur les arginine 248 et 250, dans un site consensus de phosphorylation par AKT, la méthylation bloque directement la phosphorylation médiée par AKT sur la sérine 253, ceci *in vitro* et *in vivo*. FOXO1 reste donc dans le noyau et ne peut pas être dégradée. La transcription des gènes cibles de FOXO1 est alors augmentée (Yamagata et al., 2008) (**Figure 38A**).

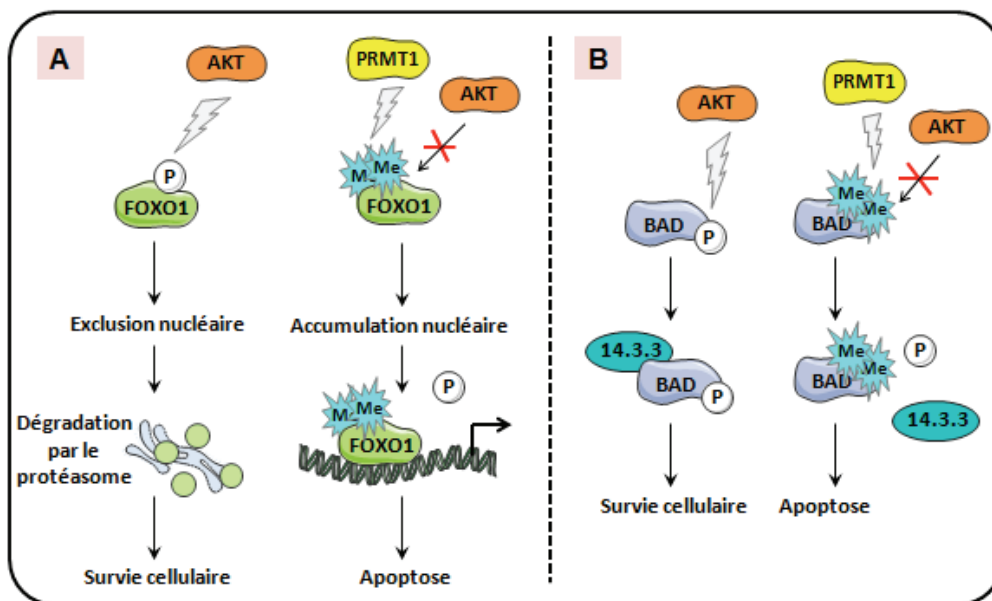


Figure 38 : La méthylation par PRMT1 bloque la phosphorylation induite par AKT

A : La méthylation de FOXO1 et **B :** la méthylation de la protéine proapoptotique BAD bloque la phosphorylation.

✓ De la même manière, PRMT1 peut se lier et méthyler la protéine proapoptotique BAD sur les arginines 94 et 96, comprises dans le motif consensus de phosphorylation par AKT. La méthylation médiée par PRMT1 de ces deux résidus inhibe la phosphorylation médiée par AKT au niveau de la sérine 99 *in vitro* et *in vivo*. La phosphorylation de BAD est nécessaire à son interaction et sa séquestration par la protéine 14.3.3. Ce mécanisme est régulé négativement par PRMT1 (Sakamaki et al., 2011) (**Figure 38B**).

PRMT1 diméthyle asymétriquement l'arginine 3 de l'histone H4, une marque associée à l'activation transcriptionnelle. Il a été identifié que la molécule effectrice TDRD3 (Tudor domain-containing protein 3) interagit avec cette méthylation. *TDRD3* est un des gènes candidats qui est ressortit comme étant un facteur pronostic du cancer du sein. Une forte expression de *TDRD3*,

favorisée par une hyperméthylation par PRMT1, est liée à un mauvais pronostic et donc une moins bonne survie des patientes.

Par ailleurs, la méthylation par PRMT1 régule les mécanismes de réparation de l'ADN. En effet, PRMT1 méthyle MRE11 et 53BP1 (p53 binding protein 1), des protéines de réparation à l'ADN, qui possèdent toutes deux des motifs GAR, (Boisvert et al., 2005; Yu et al., 2012). Il a été montré que la méthylation de MRE11 régule son activité exonucléase essentielle pour la réparation de l'ADN durant la réplication. Une dérégulation des voies de réparation de l'ADN joue un rôle majeur dans la carcinogenèse. De ce fait, l'implication de PRMT1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN soutient l'idée qu'une dérégulation de la méthylation sur arginine induit une instabilité génomique.

PRMT2.

Malgré qu'aucune activité enzymatique ne lui soit associée, PRMT2 interagit avec plusieurs récepteurs nucléaires après liaison du ligand et possède un rôle de coactivateur transcriptionnel (Qi et al., 2002). Comme PRMT1, plusieurs isoformes de PRMT2 ont été identifiées. Trois variants d'épissage de PRMT2 existent dans les tumeurs du sein, PRMT2 α , PRMT2 β et PRMT2 γ . L'étude du messenger des trois variants montre une expression augmentée des variants dans les tumeurs en comparaison avec le tissu normal. De plus, l'expression de l'ARNm de PRMT2 est corrélée avec le status ER α positif, en accord avec son rôle de coactivateur de ER α (Zhong et al., 2011, 2012). Inversement, une faible expression de PRMT2 est retrouvée dans des tumeurs ER α négatives (Richardson et al., 2006).

PRMT3.

La protéine suppresseur de tumeur DAL-1 peut interagir avec PRMT3 et inhiber son activité enzymatique (Singh et al., 2004). Sachant qu'une dérégulation de DAL-1 a été observée dans certains cancers dont le cancer du sein (Heller et al., 2007), on peut s'attendre à une augmentation de son activité enzymatique. Sachant que l'un de ces substrats est RPS2 (40S ribosomal protein S2), on peut supposer que PRMT3 peut déréguler la synthèse protéique dans les tumeurs ayant perdue DAL-1 (Swiercz et al., 2005, 2007).

CARM1.

CARM1 a été la première PRMT à être associée à la régulation transcriptionnelle (Chen et al., 1999a). Mais elle est aussi associée à de nombreux autres processus cellulaires. Une surexpression de CARM1 a été retrouvée dans des tumeurs du sein (El Messaoudi et al., 2006). Il faut noter que les tumeurs du sein agressives qui surexpriment CARM1 ont aussi une forte expression du coactivateur SRC-3. Sachant que CARM1 méthyle SRC-3, régulant ainsi son activité et sa stabilité (Feng et al., 2006; Naeem et al., 2007), les propriétés oncogéniques de SRC-3 pourraient être atténuées après inhibition de l'activité de CARM1.

De plus, Frieze et al. ont démontré que CARM1 est essentielle à la progression du cycle cellulaire induit par les œstrogènes dans les cellules de cancers du sein. Par exemple, après

stimulation œstrogénique, le promoteur du facteur de transcription E2F1 (régulateur du cycle cellulaire) subit une diméthylation dépendante de CARM1 sur l'arginine 17 de l'histone H3 (H3R17me2) parallèlement au recrutement de ER α . De plus, le recrutement de CARM1 est dépendant de SRC-3. En somme, CARM1 est un facteur critique de la carcinogenèse œstrogéno-dépendante, en aval de ER α et SRC-3 et en amont de E2F1, le facteur de transcription régulateur du cycle cellulaire (Frietze et al., 2008).

Ces différentes données indiquent que CARM1 pourrait être considérée comme une nouvelle cible dans le cadre du traitement des cancers du sein œstrogéno-dépendants. En effet, dans les cellules MCF-7, une inhibition de CARM1 par siRNA réduit le cycle cellulaire stimulé par les œstrogènes.

PRMT5.

PRMT5 a été retrouvée surexprimée dans différents types de cancers. Il a été montré que la surexpression de PRMT5 entraîne une hyper-prolifération des cellules, tandis qu'une inhibition de PRMT5 réduit la prolifération cellulaire (Pal et al., 2007). Ces résultats laissent supposer que PRMT5 joue un rôle dans la tumorigenèse. Ses rôles oncogéniques sont médiés par la méthylation de substrats impliqués dans le processus de tumorigenèse. En voici quelques exemples :

- (i) PRMT5 agit comme un répresseur transcriptionnel (Fabrizio et al., 2002). En effet, PRMT5 diméthyle symétriquement l'arginine 8 de l'histone H3 et l'arginine 3 de l'histone H4, deux marques répressives de la transcription. De ce fait, PRMT5 réprime l'expression du gène suppresseur de tumeurs ST7 (suppression of tumorigenicity 7) (Pal et al., 2004) et des régulateurs du cycle cellulaire tels que CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) et la cycline E (Karkhanis et al., 2011).
- (ii) La méthylation de PDCD4 (Programmed cell death protein 4) par PRMT5 modifie ses propriétés anti-tumorales en propriétés oncogéniques dans le cancer du sein (Powers et al., 2011). Une coexpression de PDCD4 et PRMT5 dans un modèle orthotopique de cancer du sein induit une croissance tumorale accélérée. Les auteurs ont démontré que cette induction est dépendante de l'activité catalytique de PRMT5.
- (iii) PRMT5 est aussi importante pour le processus d'EMT. Une marque de l'EMT est la perte d'expression de l'E-cadhérine. L'expression de l'E-cadhérine est en réalité réprimée par le facteur de transcription SNAIL. Hou et al. ont démontré que PRMT5 interagit avec SNAIL qui réprime ainsi son gène cible, l'E-cadhérine. Après inhibition de PRMT5, SNAIL est retrouvée sur le promoteur du gène de l'E-cadhérine, associée à une augmentation de la méthylation des arginines des histones à cet endroit, stimulant ainsi l'expression de l'E-cadhérine. Cela indique que PRMT5 est un co-répresseur de SNAIL. Ces données, associées au fait que l'expression de PRMT5 est retrouvée augmentée dans plusieurs types de cancers, pourrait laisser penser que PRMT5 est une oncoprotéine (Hou et al., 2008).

Cependant, une étude d'expression de PRMT5 a identifié une baisse d'expression de l'ARNm de PRMT5 dans des tumeurs mammaires (Finak et al., 2008). Cela pourrait s'expliquer par le rôle régulateur de PRMT5 sur la voie de signalisation EGFR. EGFR est méthylée par PRMT5 sur l'arginine 1175. Cette méthylation augmente la phosphorylation de la tyrosine 1173 en améliorant le motif de reconnaissance par la kinase ou en bloquant le site de reconnaissance d'une phosphatase. Le site de phosphorylation de la tyrosine 1173 favorise la fixation de SHP1. Le recrutement de la phosphatase SHP1 met un frein à la signalisation EGFR (Hsu et al., 2011). De ce fait, une sous-expression de PRMT5 induit une diminution de la méthylation de l'arginine 1175, la signalisation EGFR est alors augmentée, résultant ainsi en une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules épithéliales de la glande mammaire.

PRMT7.

Le gène codant pour PRMT7 est localisé dans une région du génome qui est connue pour avoir un nombre de copie aberrant dans les cancers du sein métastatiques (Thomassen et al., 2009). Il a récemment été montré que PRMT7 interagit avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF et méthyle spécifiquement H2AR3 et H4R3. En effet, PRMT7 et H2AR3 ainsi que H4R3 sont enrichis sur les gènes de réparation de l'ADN dans les cellules parentales. Karkhanis et al. ont montré que PRMT7 régule négativement l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Une perte de PRMT7 induit donc une augmentation de l'expression des gènes de réparation à l'ADN et ainsi une augmentation de la résistance cellulaire aux agents endommageants l'ADN (Karkhanis et al., 2012).

Afin de comprendre les rôles biologiques, de nombreux modèles de souris KO pour les PRMTs ont été générés. Cependant, comme nous venons de voir, dans la pathologie du cancer, on observe plus souvent une surexpression de ces PRMTs. De ce fait, afin de déterminer l'implication des PRMTs dans le cancer, de nouveaux modèles de souris surexprimant les PRMTs devraient être générés.

III- Régulation de la méthylation sur arginine

Il semble peu probable que la méthylation sur arginine soit un processus constitutif qui reste en place jusqu'à la dégradation de la protéine. Certains travaux ont apporté des réponses quant aux mécanismes régulant la méthylation sur arginine, que ce soit *via* des interactions protéiques, des modifications post-traductionnelles, des miRNAs ou plus directement par réversion de la méthylation.

1. Interactions protéiques

L'activité des PRMTs peut être régulée par des interactions protéiques. Dans la plupart des cas, ces protéines partenaires ne sont pas des substrats, mais altèrent l'activité méthyltransférase des PRMTs.

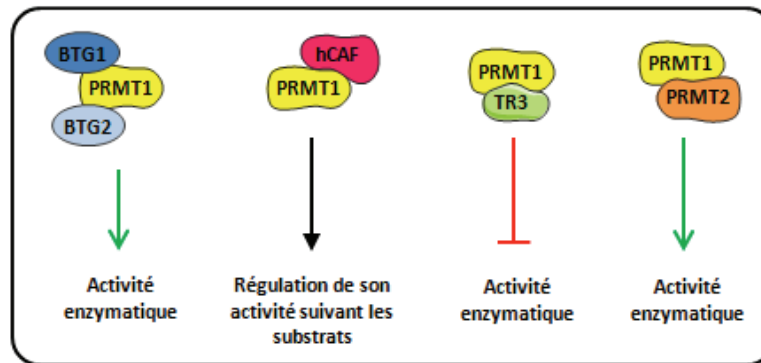


Figure 39 : Les protéines régulatrices de PRMT1

Activité stimulatrice en vert, inhibitrice en rouge, voir les deux en noir.

Différentes protéines ont été décrites pour réguler l'activité méthyltransférase de PRMT1 (**Figure 39**). (i) Les protéines BTG1 (B-cell translocation gene 1) et TIS21/BTG2 lient PRMT1 et stimulent son activité vers certains substrats (Lin et al., 1996). (ii) Notre équipe a identifié en 2007 que hCAF1 (CCR4-associated factor 1), une protéine liant BTG1 est elle aussi capable de réguler l'activité de PRMT1. Des essais de méthylation *in vitro* ont permis de montrer que hCAF1 n'est pas un substrat de PRMT1 mais que suivant les substrats, elle régule l'activité de PRMT1 (Robin-Lespinasse et al., 2007). (iii) L'activité de PRMT1 peut être régulée négativement par le récepteur orphelin TR3 (aussi appelé NR4A1). C'est en se fixant sur le domaine catalytique de PRMT1 que TR3 inhibe l'activité méthyltransférase de PRMT1 (Lei et al., 2009). (iv) L'activité de PRMT1 est augmenté lorsqu'elle s'hétérodimérise à PRMT2 (Pak et al., 2011).

La liaison du suppresseur de tumeur DAL-1 avec PRMT3 agit comme un inhibiteur de son activité enzymatique, que ce soit *in vitro* ou dans les lignées cellulaires (Singh et al., 2004).

CARM1 est retrouvée dans un complexe multiprotéique d'au moins 10 protéines appelé NUMAC (nucleosomal methylation activator complex). Ce complexe contient certaines protéines du complexe SWI/SNF dont la protéine BRG1. Lorsque CARM1 est associé à NUMAC, il acquière la capacité de méthyler l'histone H3 nucléosomale alors que la protéine recombinante ne méthyle que l'histone H3 libre (Zhong et al., 2011).

La protéine PRMT5 est inactive lorsqu'elle est exprimée dans un système bactérien. Dans les cellules de mammifères, PRMT5 est liée à MEP50 (methylosome protein 50) et cette interaction

est essentielle pour son activité (Friesen et al., 2001). De ce fait, la coexpression de PRMT5 et MEP50 dans les bactéries résulte en une protéine PRMT5 active (Martin et al., 2010). La protéine MEP50 cible l'enzyme sur ses substrats (Ho et al., 2013).

En plus de MEP50, PRMT5 peut s'associer à d'autres protéines qui régulent son activité (**Figure 40**). (i) Lorsque la protéine PRMT5 est en complexe avec les protéines Brg1 et Brm1 du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, son activité enzymatique sur H3R8 est alors augmentée (Pal et al., 2004). (ii) Le complexe de jonction des exons et la protéine de liaison à l'ARN (Y14) augmentent l'activité de MEP50/PRMT5 pour les protéines Sm (Smith antigen) du complexe snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) (Chuang et al., 2011). (iii) RIO kinase 1 (RIO domain containing protein kinase 1) et ICLN (nucleotide-sensitive chloride current-inducing *protein*) sont des adaptateurs mutuellement exclusifs qui lient MEP50/PRMT5 et régulent la spécificité du substrat de PRMT5. PRMT5 interagit exclusivement avec l'un ou l'autre de ses deux régulateurs permettant respectivement la méthylation de la nucléoline ou celle des protéines Sm (Guderian et al., 2011). (iv) Lorsque la protéine liant les histones COPR5 (cooperator of PRMT5) est associée à PRMT5, PRMT5/MEP50 méthyle préférentiellement l'arginine 3 de l'histone H4 au détriment de l'arginine 8 de l'histone H3 en empêchant la fixation de SWI/SNF sur PRMT5 (Lacroix et al., 2008).

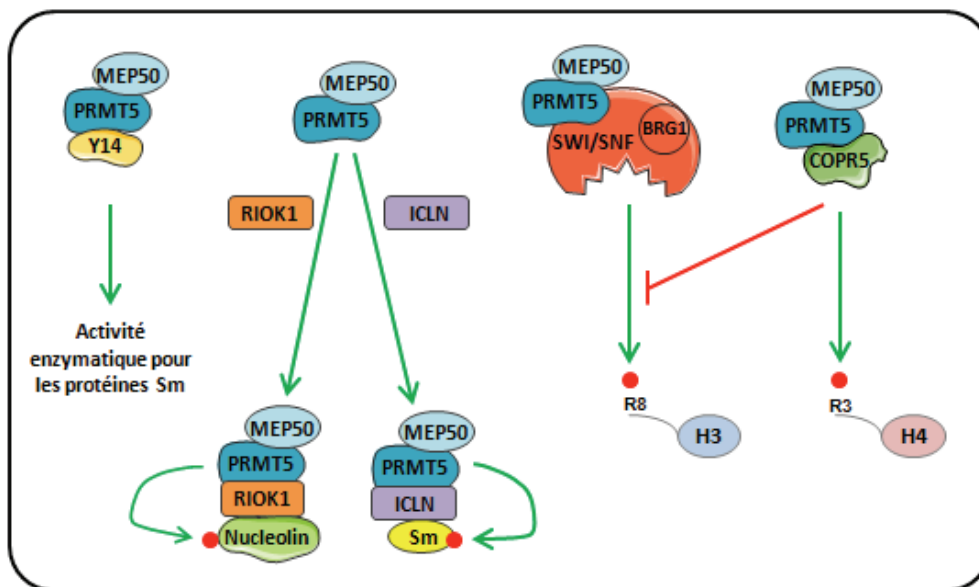


Figure 40 : Les protéines régulatrices de PRMT5

Les stimulations sont représentées en vert tandis que les inhibitions sont représentées en rouge. Les méthylations sont indiquées par des points rouges.

Pour finir, certaines PRMTs ont la capacité de s'homodimériser. Il est possible que la régulation de cette dimérisation puisse affecter l'activité de ces enzymes. En effet, si la dimérisation de PRMT1 est expérimentalement inhibée, aucune activité enzymatique n'est observée (Zhang et al., 2003).

2. Modifications post-traductionnelles

Deux types d'évènements peuvent moduler la méthylation sur arginine. Les modifications post-traductionnelles (PTM) affectant les méthyltransferases elle-mêmes, et les interrelations entre modifications.

a- Les PTM affectant les PRMTs

Récemment, il a été montré que PRMT5 est phosphorylée par une protéine mutante de la janus kinase 2 (JAK2) appelée JAK2-V617F. JAK2-V617F est une tyrosine kinase constitutivement activée. La phosphorylation de PRMT5 en N-terminale empêche son interaction avec son corégulateur MEP50, et inhibe ainsi l'activité méthyltransférase de PRMT5 (Liu et al., 2011). Par ailleurs, la phosphorylation de MEP50 par le complexe Cycline D1/CDK4 stimule l'activité méthyltransférase de MEP50/PRMT5 (Aggarwal et al., 2010).

CARM1 est phosphorylée sur la sérine 217 *in vitro* et *in vivo* durant la mitose par une enzyme non identifiée (Feng et al., 2009; Higashimoto et al., 2007). Cette phosphorylation empêche CARM1 de se lier au donneur de méthyl (adénosylméthionine) et bloque donc son activité méthyltransférase (Higashimoto et al., 2007). De plus, cette phosphorylation inactive l'activité méthyltransférase de CARM1 en perturbant le pont hydrogène avec la tyrosine 154, induisant la localisation cytoplasmique de CARM1 (Feng et al., 2009).

CARM1 peut aussi être modifiée par glycosylation par une N-acetylglucosamine transférase (OGT) *in vitro* et *in vivo* (Cheung et al., 2008). Une surexpression de OGT empêche la phosphorylation mitotique de CARM1, induisant une mauvaise localisation de la protéine pendant la mitose (Sakabe et al., 2010).

De plus, certaines PRMTs sont capables de s'autométhyliser. C'est le cas de PRMT6 et PRMT8, mais les rôles biologiques de ces modifications ne sont pas clairs (Frankel et al., 2002b; Sayegh et al., 2007). Elles pourraient favoriser l'interaction avec d'autres protéines. CARM1 est elle aussi capable de s'autométhyliser *in vitro* et *in vivo* sur l'arginine 551. La mutation de cette arginine en une lysine crée une protéine CARM1 incapable de s'autométhyliser. Bien que cette mutation n'affecte pas son activité enzymatique, cela inhibe l'activation transcriptionnelle CARM1-dépendante et son activité sur l'épissage (Kuhn et al., 2011).

b- Les PTM affectant la méthylation sur arginine

Des modifications post-traductionnelles proches du site de méthylation peuvent altérer le motif de reconnaissance des PRMTs. Les meilleurs exemples d'interrelations concernent les histones. L'acétylation de la lysine 18 de l'histone H3 (H3K18ac) prépare les histones à la diméthylation asymétrique de l'arginine 17 (H3R17me2a) par CARM1 (Daujat et al., 2002). A l'extrémité N-

terminal de l'histone H3, l'acétylation de la lysine 9 inhibe la méthylation de l'arginine 8 par PRMT5 (Pal et al., 2004) (**Figure 41**).

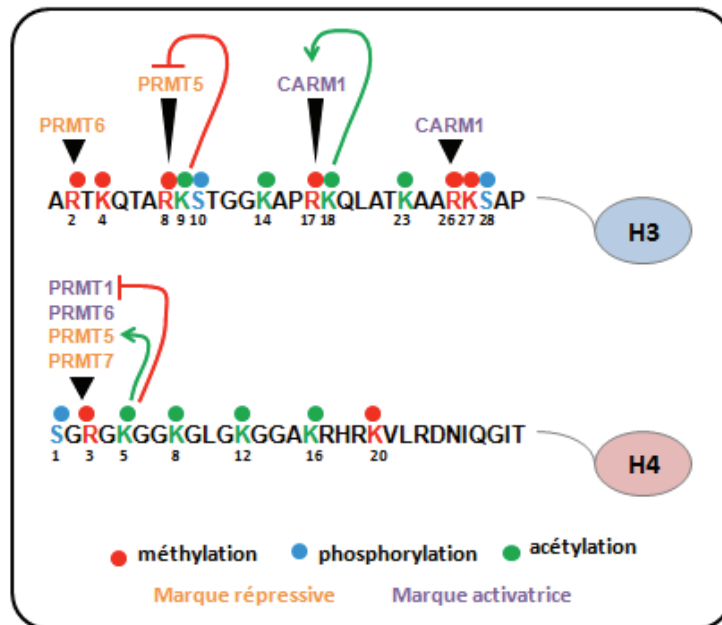


Figure 41 : Les PTM régulant la méthylation sur arginine des histones

Des PTM activatrices (flèches vertes) ou inhibitrices (flèches rouges) régulent la méthylation des histones sur arginines et donc la transcription génique.

Concernant l'histone H4, l'acétylation de la lysine 5 fait de l'arginine 3 un meilleur substrat pour PRMT5 par rapport à PRMT1, créant ainsi une balance entre une marque active (ADMA) et une marque répressive (SDMA) (Feng et al., 2011) (**Figure 41**).

Les protéines non histones sont aussi concernées par ces phénomènes. Par exemple, le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II subit une phosphorylation sur les sérines 2 et 5 qui bloquent la méthylation de l'arginine 1810 (Sims et al., 2011). Il en est de même pour ER α (pour revue (Le Romancer et al. 2011)).

3. Les microRNAs (miRNAs)

Pour finir, en plus des mécanismes qui régulent les protéines PRMTs, les niveaux d'ARN des PRMTs peuvent être régulés par des microRNAs (miRNAs).

PRMT5 est l'arginine méthyltransférase qui possède le plus de sites d'interactions avec des miRNAs. En effet, PRMT5 peut être inhibée par plus de 50 miRNAs (Wang et al., 2008c). Dans certains lymphomes, il a initialement été montré que les niveaux des miRNAs 92 et 96 (miR-92b et miR-96) sont inversement corrélés aux niveaux de PRMT5, résultant en l'augmentation des

diméthylations symétriques H3R8 et H4R3, aussi bien que dans le « silencing » de ST7 (Pal et al. 2007). De plus, d'autres miRNAs ciblant PRMT5 (miR-19a, miR-25, miR-32, miR-92, miR-92b and miR-96) sont régulés négativement entraînant ainsi une augmentation de l'expression de PRMT5 dans ces cellules (Wang et al., 2008c).

Le miR-181 est un régulateur de CARM1 qui est induit durant la différenciation des cellules souches embryonnaires, et qui réprime l'expression de CARM1 (Xu et al. 2013).

Les PRMTs peuvent aussi réguler l'expression des miRNAs. Il existe donc de possibles boucles de régulations (Mallappa et al. 2011). Par exemple, PRMT1 et CARM1 peuvent déréguler des miRNAs qui ciblent des répresseurs transcriptionnels tels que PRMT5.

4. Réversion de la méthylation

Pendant longtemps, la méthylation a été perçue comme un processus stable et permanent. Dans les années 70, des études avaient montré que la méthylation des histones était irréversible et très lentement renouvelée (Borun et al., 1972; Byvoet et al., 1972). Cependant, dans les années 90, certains travaux ont laissé entrevoir le contraire. En effet, certaines expériences suggéraient un renouvellement actif des groupements méthyles de l'histone H3 durant le cycle cellulaire (Annunziato et al., 1995). D'autres équipes ont mis en évidence que la méthylation de l'arginine 3 de l'histone H4 pouvait être cyclique et transitoire (Métivier et al., 2003). Cependant, le dogme d'une méthylation statique et stable est resté admis encore pendant plusieurs années. De plus, la stabilité des marques de méthylation s'intégrait parfaitement dans les modèles statiques du stockage de l'information épigénétique (Jenuwein et al., 2001). Il a fallu attendre 2004, avec la découverte des déiminases puis des premières arginines déméthylases pour que ce dogme change.

a- Les déiminases

Les résidus arginines non modifiés des histones peuvent être convertis par des déiminases pour produire des citrullines (Hagiwara et al., 2002; Nakashima et al., 2002). Cette observation a conduit à l'hypothèse que les résidus arginines des histones pouvaient aussi être ciblés par cette classe d'enzymes afin de produire une citrulline *via* une réaction de déméthylimination (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Le génome humain code pour quatre peptidylarginine deiminases (PADI). L'enzyme PADI4, majoritairement nucléaire, a été identifiée pour bloquer la méthylation sur résidus arginine en convertissant l'arginine méthylée en citrulline lors d'une réaction de déimination (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004). Cependant les cinétiques *in vitro* mesurant l'activité enzymatique de PADI4 indiquent que cette enzyme est bien moins efficace sur les arginines méthylées que sur les résidus non modifiés (Kearney et al., 2005).

Néanmoins, *in vivo*, PADI4 a la capacité d'empêcher la méthylation sur arginine des histones (Cuthbert et al., 2004; Wang et al., 2004).

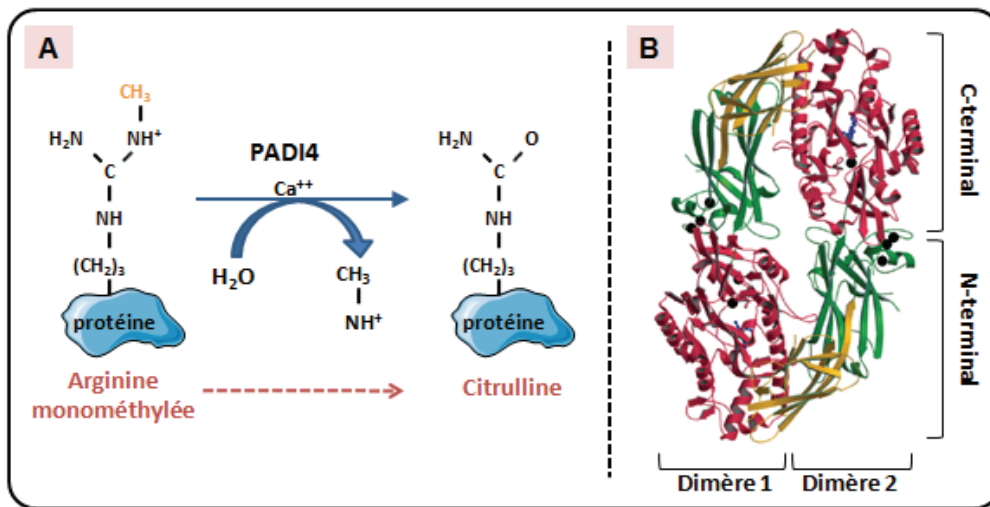


Figure 42 : Le processus de déméthylimination

A : La déméthylimination d'une arginine monométhylée est catalysée par PADI4, une peptidylarginine déiminase Ca^{2+} dépendante, et résulte en une citrulline. **B :** Dimère de PADI4. Le domaine N-terminal d'une molécule de PADI4 interagit avec le domaine C-terminal d'une seconde molécule pour former un dimère stable.

D'après (Arita et al. 2004).

PADI4 effectue une déméthylimination d'une arginine méthylée par une réaction d'hydrolyse qui produit une quantité égale de citrulline et de méthylamine (**Figure 42A**). PADI4 est une enzyme dimérique dont l'extrémité N-terminale d'une molécule s'associe avec l'extrémité C-terminale d'une autre. Le domaine N-terminal de PADI4 forme une fente renfermant le site actif responsable de la déimination (**Figure 42B**). Deux ions calciums sont associés au site actif et induisent le changement conformationnel qui suit leur liaison et stabilise la région, résultant en une enzyme fonctionnelle (Arita et al., 2004). Quand PADI4 rencontre l'extrémité N-terminale des histones H3 et H4, PADI4 dirige la chaîne latérale de l'arginine cible au fond de la fente du site actif. PADI4 ne reconnaît pas une séquence d'acides aminés définie, mais semble plutôt reconnaître une séquence non structurée autour de l'arginine cible. Cependant, cette enzyme a la capacité de déiminer seulement l'état monométhylé (Arita et al., 2004).

PADI4 a pour substrat les histones H3 et H4, et peut déiminer les arginines 2, 8 et 26 de l'histone H3 ainsi que les résidus méthylés par les coactivateurs CARM1 (H3R17) et PRMT1 (H4R3) (Hagiwara et al., 2002; Lee et al., 2005d). Une diminution de la méthylation des histones est concomitante avec une augmentation de la citrullination, requise pour l'activité de PADI4 (Wang et al., 2004).

PADI4 ne déimine pas seulement les histones, mais aussi des substrats non histone. Par exemple, PADI4 déimine p300. CARM1 méthyle l'arginine 2142 de p300, qui est avec l'arginine 2088, un site important de liaison avec SRC-2. La méthylation de p300 inhibe l'interaction de

SRC-2 avec p300 *in vitro* et *in vivo*. Cette méthylation peut être réversée par PADI4, favorisant l'interaction p300/SRC-2. La déméthylimination change ainsi la conformation et l'activité de SRC-2 dans le complexe de régulation de la transcription (Lee et al., 2005d).

Du fait que cette enzyme convertie les arginines monométhylées en citrulline plutôt qu'en arginine non-modifiée, les déiminases ne peuvent pas être considérées comme de vraies déméthylases. Cependant, cette découverte a contribué à changer la vision de la méthylation. La méthylation est alors apparue comme un mécanisme dynamique et réversible.

b- Les déméthylases

i. Généralités

Il a de cela presque 50 ans, l'activité enzymatique permettant de déméthylé une lysine modifiée a été identifiée dans des extraits tissulaires par une réaction d'amine oxydase qui utilise le cofacteur FAD (flavin adenine dinucleotide) et produit du formaldéhyde et une lysine non modifiée (Kim et al., 1964). Plus tard, une activité enzymatique avec des propriétés similaires a été décrite pour catalyser la déméthylation des histones (Paik et al., 1973). Cependant, l'identité de l'histone déméthylase restait insaisissable.

La première vraie déméthylase LSD1 (« lysine-specific demethylase-1 ») fut découverte fin 2004 (Shi et al., 2004). Cette enzyme est une amine oxydase FAD-dépendante (flavin adenine dinucleotide) qui déméthyle les lysines méthylées. La caractéristique enzymatique de cette réaction de déméthylation est le fait que FAD soit requis comme cofacteur dans une réaction qui dégage du peroxyde d'hydrogène et du formaldéhyde comme produits (**Figure 43A**). Néanmoins, le mécanisme utilisé par LSD1 nécessite un nitrogène protoné pour initier la déméthylation, limitant l'enzyme à ne déméthylé que les mono ou diméthylations sur lysine comme substrats possibles (Shi et al., 2004). Des analyses *in vitro* de la protéine recombinante LSD1 ont révélées que LSD1 seule peut seulement déméthylé la lysine 4 de l'histone H3 native, c'est-à-dire sans l'ADN associé (Shi et al., 2004). Cette propriété était à ce moment là très surprenante du fait que les nucléosomes sont les substrats physiologiques de LSD1 *in vivo*. L'isolement et la caractérisation du complexe de déméthylation autour de LSD1 a permis de montrer que LSD1 a besoin de Co-REST, un répresseur transcriptionnel associé à la chromatine, pour déméthylé les nucléosomes (Lee et al., 2005c; Shi et al., 2005). *In vitro*, les protéines recombinantes LSD1/Co-REST sont suffisantes pour permettre la déméthylation nucléosomale par LSD1. Cependant, LSD1 est aussi stimulée par l'activité déacétylase HDAC1-dépendante (associée au complexe LSD1). Dans le cas de LSD1, la protéine reconnaît une portion étendue de l'extrémité de l'histone H3, ce qui suggère que la reconnaissance de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 peut être régulée par l'acétylation des histones (Forneris et al., 2006). Il a été montré que le complexe LSD1/Co-REST est moins efficace sur l'hyperacétylation des nucléosomes (Lee et al., 2006; Shi et al., 2005), et que la déméthylation de peptides H3K4 est complètement abolie quand ces peptides contiennent les résidus K9, K14 et K18 acétylés

(Forneris et al., 2006). L'utilisation de facteurs purifiés *in vitro* montre que la déméthylation des nucléosomes est augmentée par le complexe LSD1/Co-REST en présence de HDAC1 (Lee et al., 2006).

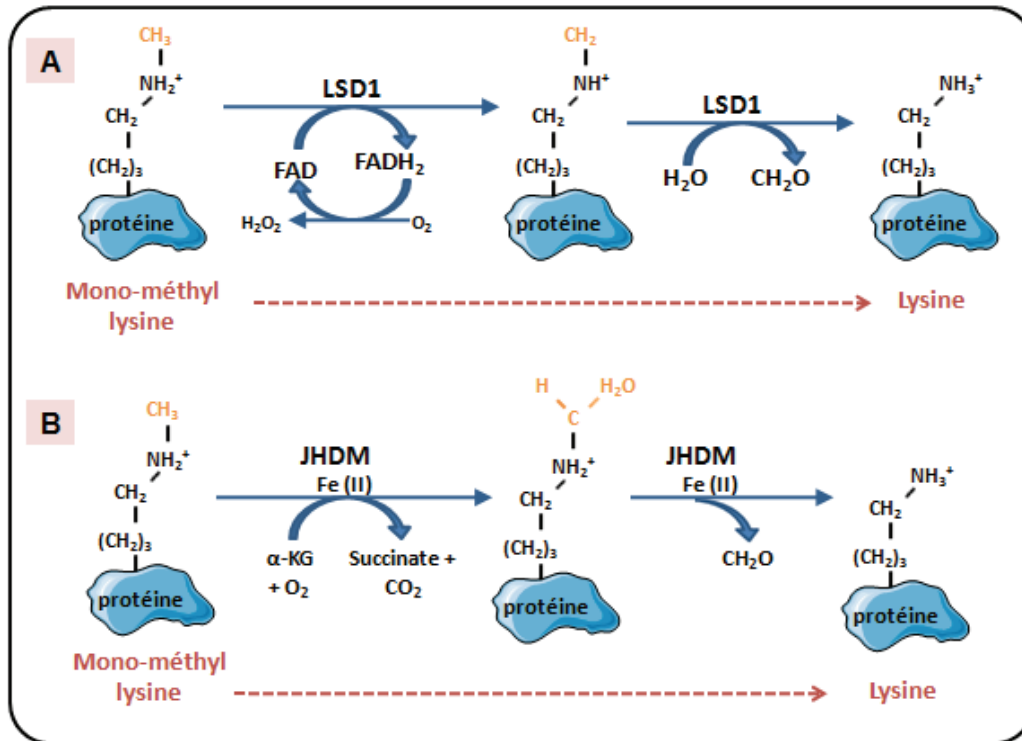


Figure 43 : Le processus de déméthylation sur lysine.

A : LSD1 catalyse la déméthylation de résidus lysines utilisant FAD comme cofacteur. L'imine intermédiaire est hydroxylé pour former un formaldéhyde (CH₂O) par un processus non enzymatique. **B :** Le domaine JmjC utilise le fer (Fe²⁺) et l'α-kétoglutarate (α-KG) comme cofacteurs dans une réaction de déméthylation oxydative qui produit une hydroxyméthyl-lysine. Le groupe hydroxyméthyle est alors spontanément perdu en formaldéhyde (CH₂O).

Une autre famille de lysines déméthylases décrites est la famille JmjC. Cette classe d'enzymes s'avère être une famille relativement conservée de lysine déméthylases. Le domaine catalytique définissant le groupe est le domaine JmjC (Jumonji-C). La réaction oxydative de déméthylation nécessite à la fois du fer (Fe(II)) et de l'α-kétoglutarate (α-KG) pour catalyser l'hydroxylation du groupement méthylamine de la lysine, produisant ainsi du succinate et de dioxyde de carbone (**Figure 43B**). Le groupement hydroxyméthyle est perdu spontanément en formaldéhyde, libérant ainsi un groupement méthyle d'une lysine modifiée (Tsukada et al., 2006). La séquence d'acides aminés du domaine JmjC est similaire à celle des autres oxygénases dépendantes de l'α-kétoglutarate. Le site catalytique, formé de huit brins β typiques de cette classe de metalloenzymes, forme le noyau du domaine JmjC. La structure du noyau du domaine JmjC fournit un échaffaud rigide qui permet l'association d'une molécule de fer (Fe²⁺) dans une séquence consensus de résidus de type histidine et acide glutamique (HxE/Dx_nH). Le cofacteur α-kétoglutarate fournit des interactions additionnelles qui favorisent la stabilisation de la structure (Chen et al., 2006).

ii. Arginines déméthylases

Très peu de choses sont connues concernant les arginines déméthylases, puisque à ce jour la seule et unique arginine déméthylase décrite est JMJD6 (Chang et al., 2007).

JMJD6, alias PSR

JMJD6 avait initialement été identifié comme le récepteur aux phosphatidylsérines (PSR), responsable de la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages et les cellules dendritiques (Fadok et al., 2000). En 2000, afin de trouver une protéine capable de lier la phosphatidylsérine (PS), Fadok et ses collaborateurs ont généré des anticorps monoclonaux contre des macrophages humains traités au TGF- β / β -glucan pour induire la reconnaissance de la phosphatidylsérine. C'est ainsi qu'ils ont mis en évidence l'anticorps mAb217 qui empêche l'absorption des cellules apoptotiques. Après analyse de la nature moléculaire de cet antigène par « phage display », ils ont identifié une protéine d'environ 48kDa, le récepteur à la phosphatidylsérine (PSR), extrêmement conservé, possédant un domaine transmembranaire prédit. Cette protéine est exprimée à la surface des macrophages, fibroblastes et cellules épithéliales (Fadok et al., 2000). A la suite de cela, il a été montré que l'interaction de la phosphatidylsérine avec PSR n'est pas tellement impliquée dans le recrutement des cellules apoptotiques vers les phagocytes mais plutôt dans l'ingestion des cellules apoptotiques (Hoffmann et al., 2001).

Trois équipes ont généré des souris invalidées pour PSR dans des fonds génétiques différents (Böse et al., 2004; Kunisaki et al., 2004; Li et al., 2003b). Ces souris présentent une létalité néonatale accompagnée par des défauts de développement mais n'ont pas permis de conclure quant au rôle de PSR dans le processus de phagocytose. Tandis que certains valident ce rôle, l'étude de Böse et ses collaborateurs a montré que l'anticorps anti-PSR utilisé dans l'étude initiale, reconnaît encore le récepteur dans les cellules délétées pour PSR (Böse et al., 2004).

D'autre part, deux études ont montré une localisation nucléaire de PSR (Cui et al., 2004; Cikala et al., 2004). Cela suggère que PSR peut être impliqué dans d'autres processus. Sachant que PSR est très bien conservé dans l'évolution, Cikala et al. ont cherché à voir si PSR était aussi présent chez l'Hydre, afin d'étudier sa fonction. Après avoir identifié l'ADNc de PSR chez l'hydre, ils ont identifié trois signaux de localisation nucléaire, un domaine JmjC et un domaine de liaison à l'ADN AT-hook (**Figure 44**). De plus, ils retrouvent PSR dans le noyau et une homologie structurale de PSR avec FIH-1 (factor inhibiting HIF) qui possède une activité oxygénase dépendante du fer et de l'oxoglutarate (Cikala et al., 2004). Parallèlement, l'étude de Cui et al. a elle aussi montré PSR humain dans le noyau grâce à 5 signaux de localisation nucléaire (Cui et al., 2004). Cependant, leur analyse en utilisant le programme PSORT n'a pas retrouvé le domaine transmembranaire décrit précédemment. Ces résultats sont en désaccord avec la description initiale de PSR qui décrivait l'implication de PSR dans la dégradation des cellules apoptotiques (Fadok et al., 2000). De plus, un domaine poly-sérine a été identifié dans la structure protéique de PSR qui permettrait sa localisation nucléaire (Wolf et al., 2013).

Une étude plus récente a montré que PSR pourrait être une protéine qui se localise dans le cytoplasme et le noyau suivant le contexte de la cellule. En effet, il a été montré que JMJD6 est initialement présent à la surface cellulaire des phagocytes immatures (1 ou 2 jours après activation) puis qu'il est transloqué dans le noyau des cellules différenciées (5 à 9 jours après activation). Dans le cas des macrophages, PSR est un récepteur associé à la membrane qui régule la phagocytose des macrophages immatures mais n'est pas indispensable pour la phagocytose lorsqu'il est exprimé dans le noyau et le cytoplasme des macrophages matures (Zakharova et al., 2009).

On peut imaginer que PSR fait la navette entre le noyau et le cytoplasme grâce à ses signaux de localisation nucléaire intrinsèque. Un tel mécanisme a déjà été décrit pour Notch, une protéine transmembranaire qui peut être transloquée dans le noyau grâce à ses signaux de localisation nucléaire (Lieber et al., 1993). A la suite de ces travaux, sachant que PSR fonctionne comme une dioxygénase dépendante de l'oxoglutarate et qu'elle possède un domaine JmjC (Cikala et al., 2004), le comité international de standardisation génétique (ICSGNM : International Committee for Standardized Genetic Nomenclature in Mice) a renommé PSR en JMJD6.

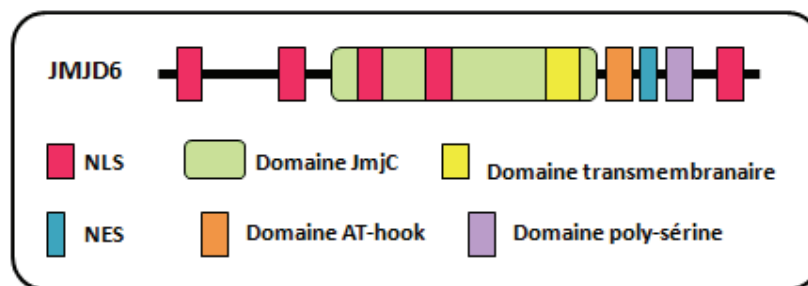


Figure 44 : Représentation schématique des domaines de JMJD6.

JMJD6 est composée de différents domaines autour de son domaine JmjC.

JMJD6, une arginine déméthylase

Ce n'est qu'en 2007 que JMJD6 (Jumonji domain-containing 6 protein) a été décrite comme la première et jusqu'à présent unique arginine déméthylase décrite (Chang et al., 2007). Les auteurs ont montré que JMJD6 déméthyle spécifiquement l'histone H3 sur l'arginine 2 et l'histone H4 sur l'arginine 3. De manière similaire aux lysines déméthylases de la famille JmjC, JMJD6 est une dioxygénase qui a besoin de fer et d' α -kétoglutarate pour réaliser son activité catalytique. Lors de l'évènement de déméthylation par JMJD6, l'hydroxylation d'un groupement méthyle est immédiatement suivi d'une déformylation produisant du formaldéhyde. Cette étude a été réalisée *in vitro*, *in vivo* puis confirmé par spectrométrie de masse. En plus du produit déméthylé attendu (H4R3me1), deux autres produits ont été observés qui s'avère être des produits d'oxydation (+16 et +32 daltons). Il semblerait que les lysines 5 et 8 sont oxydées. De telles oxydations ont aussi été retrouvées avec l'histone H3 (Chang et al., 2007).

JMJD6 possède un domaine JmjC similaire à celui des lysines déméthylases et une très grande homologie avec JHDM1A, JHDM3A et JARID1A (Chang et al., 2007; Hahn et al., 2008). Cependant, JMJD6 ne dispose pas de domaines de reconnaissance du type Tudor ou PHD qui pourrait cibler JMJD6 sur les histones (Chang et al., 2007). Cela pourrait expliquer la faible activité de la protéine recombinante *in vitro*. JMJD6 pourrait avoir besoin de protéines partenaires pour la diriger vers son substrat (Chang et al., 2007; Hahn et al., 2008).

JMJD6, une hydroxylase

En 2009, une étude a retrouvé le phénomène d'oxydation de lysine. Plus précisément, Webby et al. ont démontré que JMJD6 catalysait la lysyl-5-hydroxylation du facteur d'épissage U2AF65 (U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 65-kilodalton), ce qui induirait des changements dans l'épissage de l'ARN de certains des gènes cibles, suggérant un rôle de JMJD6 dans la régulation de l'épissage (Webby et al., 2009). Dans cette étude, ils mettent en évidence le phénomène d'hydroxylation de U2AF65, déjà observé par Chang et al. (Chang et al., 2007). Cependant, ils ne retrouvent pas cet événement sur les histones, ni de déméthylation sur arginine, suggérant qu'ils ne sont pas dans les conditions idéales pour observer ce phénomène.

Ce n'est que très récemment que l'activité hydroxylase suggérée initialement par Chang et al. a été confirmée. Une étude a démontré que JMJD6 hydroxyle *in vivo* des résidus lysines des histones H2A/H2B et H3/H4 (Mantri et al., 2011; Unoki et al., 2013). Pour la première fois, Unoki et al. ont montré que JMJD6 a besoin d'un partenaire, UHRF1 (ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1) pour reconnaître les histones modifiées et catalyser leur hydroxylation. L'hydroxylation d'un résidu lysine inhibe complètement la méthylation et inversement, la monométhylation d'une lysine bloque complètement l'hydroxylation par JMJD6, indiquant que JMJD6 est essentielle pour la régulation du code histone (Unoki et al., 2013).

La plupart des membres de la famille JmjC catalyse l'hydroxylation de groupements N-méthyle sur le groupement ϵ -amino d'un résidu lysine et génère ainsi un groupement hydroxyméthyle, qui est immédiatement transformé en formaldéhyde, résultant ainsi en une déméthylation d'un résidu lysine. Cependant, JMJD6 ne semble pas ajouter le groupement hydroxyle sur le groupement N-méthyle, mais plutôt sur un des carbones basiques de la chaîne latérale de la lysine et générer ainsi une 5-hydroxylation stable (Webby et al., 2009). Mais, on ne peut exclure que dans certaines situations JMJD6 soit capable d'hydroxyler des résidus sur le groupement N-méthyle, conduisant ainsi à une déméthylation.

Ce qui semble bien établi, c'est le fait que JMJD6 ne catalyse pas de déméthylation sur lysine des résidus H3K4, H3K9, H3K27, H3K36 et H4K20 (Hahn et al., 2010). On peut peut-être attribuer cela au fait que JMJD6 catalyse l'hydroxylation sur lysine sur des carbones basiques.

Etudes structurales de JMJD6

L'analyse structurale de JMJD6 supporte le fait que JMJD6 est plus proche des autres membres de la famille JmjC. Cependant, il y a une différence au niveau de la structure du site actif de JMJD6 par rapport aux lysines déméthylases possédant un domaine JmjC et à l'hydroxylase de

HIF (Hong et al. 2010; Mantri et al. 2010). (i) JMJD6 a la capacité de se lier avec l'ARN simple brin (Hong et al. 2010). (ii) JMJD6 serait donc une sous-famille à part entière.

JMJD6 dans le noyau

De façon intéressante, il a été mis en évidence que JMJD6 se localise majoritairement dans les speckles (Webby et al., 2009). Les speckles sont des compartiments sub-nucléaires enrichis en snRNP et facteurs d'épissage (Lamond et al., 2003). De plus, PRMT1 est une méthyltransférase que l'on retrouve dans ces structures (Robin-Lespinasse et al., 2007). De même, un anticorps général reconnaissant les diméthylations asymétriques sur arginine se localise majoritairement dans les speckles, suggérant que de nombreuses protéines diméthylées asymétriquement se localisent dans ces structures (Robin-Lespinasse et al., 2007).

Des observations suggèrent une forte implication de JMJD6 dans les processus d'hydroxylation/déméthylation : (i) JMJD6 déméthyle les histones H3 et H4, (ii) JMJD6 hydroxyle les histones et U2AF65, (iii) JMJD6 se localise dans les speckles. Son activité sur d'autres substrats doit être étudiée.

JMJD6 et cancer

Une surexpression de JMJD6 serait associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein et du poumon (Lee et al., 2012; Zhang et al., 2013). Lee et al. ont démontré qu'une forte expression du messager de JMJD6 est retrouvée dans des tumeurs agressives. Dans des lignées cellulaires de cancers du sein, après inhibition ou surexpression de JMJD6, les auteurs ont démontré que JMJD6 régule le pouvoir prolifératif et migratoire des cellules (Lee et al., 2012). De plus, le niveau d'expression de JMJD6 est plus important dans des adénocarcinomes de poumon que dans le tissu normal. JMJD6 est décrit pour être un facteur indépendant de mauvais pronostic (Zhang et al., 2013).

Ces résultats sont en adéquation avec une étude précédente qui démontrait l'implication de JMJD6 dans l'angiogénèse. JMJD6 serait impliqué dans la régulation de l'épissage de VEGF-receptor 1 (Flt1). L'inhibition de JMJD6 induit un épissage différentiel de Flt1 générant ainsi une forme soluble de Flt1 (sFlt), qui se lie au VEGF et inhibe ainsi l'angiogénèse. *In vitro* et *in vivo*, par ce mécanisme, l'inhibition de JMJD6 conduit à une inhibition de l'angiogénèse (Boeckel et al., 2011).

B- Résultats

Les œstrogènes jouent un rôle majeur dans le développement du cancer du sein. A l'heure actuelle, ER α est un marqueur clé pour le choix du traitement. En effet, les tumeurs exprimant ER α sont traitées par hormonothérapie. Bien que ces approches se soient montrées bénéfiques à un grand nombre de patientes, environ 40% d'entre elles présentent une résistance acquise aux thérapies et leur pronostic de survie est faible. De plus, ces dernières années, une meilleure compréhension des voies de signalisations cellulaires a permis le développement de nouveaux traitements, tels que les inhibiteurs de mTor ou de Src. Les données tendent d'ailleurs à montrer que les combinaisons de thérapies sont plus bénéfiques que la monothérapie. Cependant, afin d'éviter le surtraitement pour des patientes qui n'en tireront qu'un bénéfice minime et souffriront d'effets toxiques, ou encore un traitement inadapté à la maladie, il est nécessaire de définir des critères moléculaires qui permettront aux cliniciens d'orienter la thérapie des patientes. Il est donc important de mieux préciser la physiopathologie des tumeurs et en particulier de définir le rôle joué par les différents acteurs protéiques de la signalisation hormonale, qui peuvent être à l'origine des dérégulations observées dans les cellules cancéreuses.

A mon arrivée en thèse, l'équipe de Laura Corbo venait de démontrer que ER α était méthylé par PRMT1 sur l'arginine 260. Cette modification est un prérequis à la formation du complexe mER α /Src/PI3K/FAK et à l'activation d'AKT *en aval* (Le Romancer et al., 2008). De plus, la méthylation de ER α est un processus physiologique dérégulé dans les tumeurs du sein. Je me suis donc intégrée dans cette thématique de recherche et mon projet de thèse visait à mieux comprendre la régulation de la méthylation de ER α . Il s'est déroulé autour de deux objectifs interconnectés.

Le premier objectif concerne l'étude de l'expression du complexe mER α /Src/PI3K dans les tumeurs du sein. En effet, les voies de signalisation non génomiques sont controversées. Leur existence *in vivo* n'a jamais été réellement établie.

Le second aspect concerne la régulation de la méthylation du récepteur. La méthylation sur arginine de ER α est trouvée dérégulée dans les tumeurs mammaires *in vivo*. *In cellulo*, la méthylation de ER α est un phénomène rapide et transitoire suggérant l'implication d'un mécanisme régulant ER α et permettant la dissociation du complexe. Afin de mieux appréhender les mécanismes de régulation de la méthylation de ER α , au laboratoire, nous nous sommes intéressés à deux protéines cibles ; LKB1 identifiée comme partenaire potentiel de ER α suite à un criblage double hybride réalisé par l'équipe de Sylvie Mader (IRIC, Université de Montréal) et l'arginine déméthylase JMJD6 (Chang et al., 2007).

I- Les voies non génomiques mER α /Src/PI3K dans le cancer du sein

a- Introduction

L'action des œstrogènes est médiée *via* son récepteur, le récepteur aux œstrogènes. Ce dernier fonctionne comme un facteur de transcription dépendant du ligand selon une voie de signalisation génomique. En plus de cela, ER α peut agir selon des voies non génomique (Pietras et al., 1977). Ces effets se réfèrent à des événements extrêmement rapides après stimulation œstrogénique. Bien que cette voie de signalisation ait été mise en évidence il y a de nombreuses années, il existe une controverse quant à la nature du récepteur, la localisation des voies non génomiques et leur existence *in vivo* (Pedram et al., 2006; Warner et al., 2006). De nombreuses évidences indiquent que les œstrogènes activent les voies non génomiques *via* une fraction de ER α conventionnel dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique. De nombreux partenaires extranucléaires de ER α ont été décrits, mais le corps du complexe comprend la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K et la tyrosine kinase Src (Castoria et al., 2001; Simoncini et al., 2000). Cela conduit à l'activation de molécules de signalisation telles que les MAPK et AKT induisant prolifération et survie cellulaire.

Au niveau mécanistique, dans des lignées cellulaires, l'équipe a démontré que la méthylation de ER α est le prérequis à la formation du complexe ER α /Src/PI3K et à l'activation des voies de signalisation *en aval*. De plus, la méthylation de ER α est un processus physiologique puisque ER α est faiblement méthylé dans les cellules épithéliales mammaires et hyperméthylé dans des tumeurs mammaires humaines. En effet, 50% des tumeurs du sein expriment un fort niveau de ER α méthylé dans le cytoplasme des cellules épithéliales, indépendamment de la présence de ER α dans le noyau (Le Romancer et al., 2008). En réalité, lors de l'analyse moléculaire de ER α au niveau anatomopathologique, la population de ER α positive inclue seulement les tumeurs présentant une expression nucléaire de ER α , à un seuil de 10% de cellules marquées. La signalisation non génomique est de ce fait totalement ignorée, alors que ER α est méthylé dans la moitié des tumeurs mammaires.

Même si les résultats de l'équipe suggèrent que la méthylation de ER α déclenche les voies de signalisation non génomique, nous n'avons pas d'évidence de cela *in vivo*. Nous avons donc décidé d'étudier la présence du complexe mER α /Src/PI3K dans des tumeurs du sein. Pour cela, nous avons utilisé la technologie du Duolink, aussi appelée « Proximity Ligation Assay » (PLA). Cette technique permet de visualiser des interactions protéiques *in vivo* que ce soit sur des cellules ou sur des tissus fixés (Söderberg et al., 2006) (**Figure 45**). Dans notre cas, nous sommes intéressés aux interactions ER α /Src et ER α /PI3K. Cette technologie permet également d'analyser l'expression et la localisation de modifications post-traductionnelles. Pour cette raison, nous avons aussi étudié la méthylation de ER α en Duolink en couplant l'anti-méthyl-ER α (mER α) avec un anticorps anti-ER α .

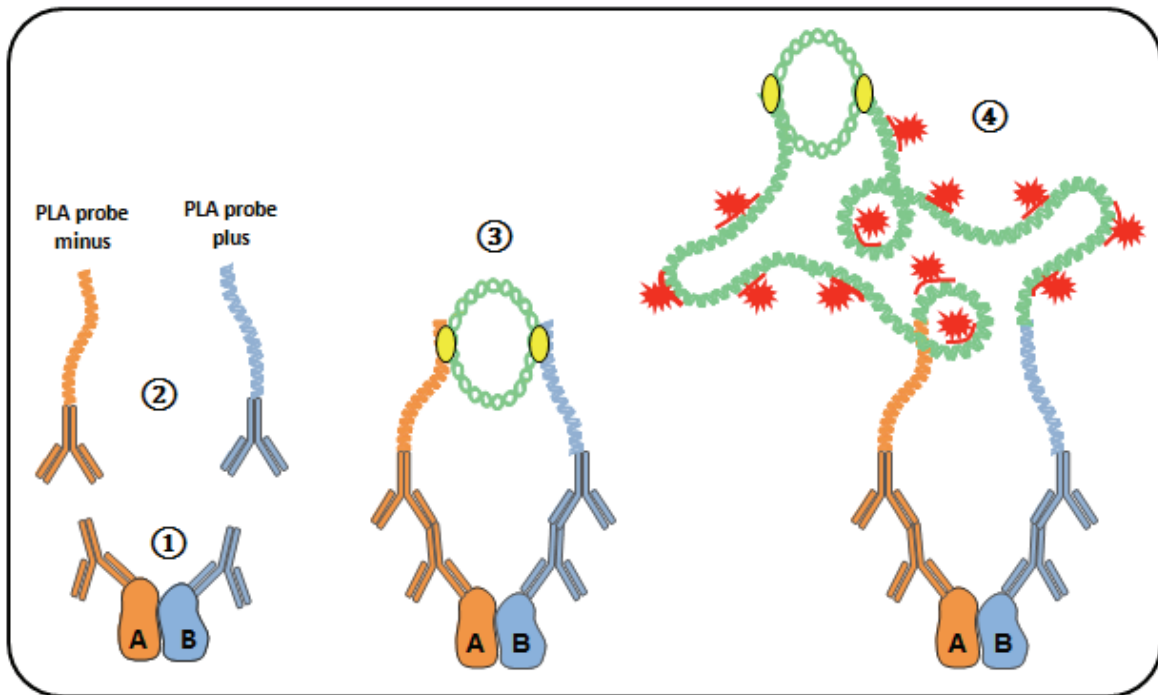


Figure 45 : La technologie du Duolink (PLA : « Proximity ligation assay »)

Cette technique permet de visualiser des interactions protéiques *in vivo*. **(1)** Dans un premier temps, les cellules sont incubées avec deux anticorps primaires spécifiques des protéines d'intérêts produits chez deux espèces différentes **(2)** Ensuite, les anticorps secondaires conjugués avec des oligonucléotides (Sonde PLA minus Souris et PLA plus Lapin) sont ajoutés à la réaction. **(3)** Des oligonucléotides complémentaires aux sondes PLA sont ajoutés et s'hybrident aux deux sondes PLA dans les cas où les protéines d'intérêt sont très proches. De plus, la ligase permet de fixer fermement les deux oligonucléotides hybridés. **(4)** Enfin, la polymérase permet l'amplification de l'oligonucléotide créant une réaction d'amplification en « cercle-glissant » ; RCA (Rolling-circle amplification) à partir de la boucle initiale. De plus, dans cette étape, des oligonucléotides marqués sont ajoutés et s'hybrident avec le produit RCA. L'interaction entre deux protéines est facilement visible par un point rouge. Les images sont analysées par microscopie à fluorescence et les points rouges quantifiés grâce au logiciel Image J.

La technologie du Duolink permet de quantifier des interactions protéiques. En effet, si les protéines d'intérêts sont suffisamment proches dans la cellule (<40 nm de distance), les sondes vont s'hybrider et s'amplifier. On visualisera une interaction entre deux protéines ou une modification post-traductionnelle par un point rouge dans la cellule. De ce fait, on peut quantifier précisément le nombre de points par cellules. Nous avons dénombré ces interactions tout au long de ce travail, que ce soit dans les cellules ou dans les tumeurs grâce au logiciel image J.

Dans un premier temps, nous avons validé les interactions ER α /Src et ER α /PI3K par PLA dans différents modèles cellulaires. Dans un second temps, une étude de l'expression des complexes ER α /Src, ER α /PI3K et ER α /mER α a été réalisée sur 175 tumeurs humaines de patientes du Centre Léon Bérard. Des TMAs (Tissue Micro Array) ont été réalisés par le département d'anatomopathologie (Isabelle Treilleux, Sophie Goddard-Léon, Amélie Colombe). La base de données du Centre permet de centraliser le suivi des patientes réalisé par les médecins (Olivier

Tredan et ses collaborateurs) et l'analyse statistique *en aval* a été réalisée par l'UBET (Unité de biostatistique) (*Emilie Lavergne, Sylvie Chabaud*).

L'étude du complexe mER α /Src/PI3K dans les tumeurs mammaires a permis de montrer que ce complexe existe *in vivo*, et que sa surexpression est corrélée à l'activation de l'effecteur de la voie en aval, AKT. De plus, une surexpression de ce complexe est un facteur indépendant de mauvais pronostic, et est associée à une réduction de la survie sans progression. Ces résultats sont décrits dans l'article n°1 intitulé « *Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers* » (publié dans EMBO Molecular Medicine en 2012).

b- Article 1

Activation of rapid œstrogen signalling in aggressive human breast cancers

Coralie Poulard*, Isabelle Treilleux*, Emilie Lavergne, Katia Bouchekioua-Bouzaghrou, Sophie

Goddard-Léon, Sylvie Chabaud, Olivier Trédan, Laura Corbo, Muriel Le Romancer

** Egale contribution*

Article publié dans EMBO Molecular Medicine en Novembre 2012.

Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers

Coralie Poulard^{1,2,3,4,5,6†}, Isabelle Treilleux^{1,2,3,4,5,6,7†}, Emilie Lavergne⁸,
Katia Bouchekioua-Bouzaghoul^{1,2,3,4,5,6}, Sophie Goddard-Léon⁷, Sylvie Chabaud⁸,
Olivier Trédan⁹, Laura Corbo^{1,2,3,4,5,6}, Muriel Le Romancer^{1,2,3,4,5,6*}

Keywords: arginine methylation; breast cancer; oestrogen receptors; PI3K; Src tyrosine kinase

DOI 10.1002/emmm.201201615

Received May 31, 2012

Revised September 04, 2012

Accepted September 05, 2012

Oestrogen receptors can mediate rapid activation of cytoplasmic signalling cascades by recruiting Src and PI3K. However, the involvement of this pathway in breast cancer remains poorly defined. We have previously shown that methylation of ER α is required for the formation of the ER α /Src/PI3K complex and that ER α is hypermethylated in a subset of breast cancers. Here, we used Proximity Ligation Assay to demonstrate that this complex is present in the cytoplasm of breast cancer cell lines as well as formalin-fixed, paraffin-embedded tumours. Of particular interest, the analysis of 175 breast tumours showed that overexpression of this complex in a subset of breast tumours correlates to the activation of the downstream effector Akt. Survival analysis revealed that high expression of this complex is an independent marker of poor prognosis and associated with reduced disease-free survival. Our data introduces the new concept that the rapid oestrogen pathway is operative *in vivo*. It also provides a rationale for patient stratification defined by the activation of this pathway and the identification of target therapies.

INTRODUCTION

The existence of extranuclear steroid signalling has been known for almost 40 years (Pietras & Szego, 1977), although the molecular mechanisms involved still remain elusive. Oestrogen mediates its effects through ER α and ER β , which function in the nucleus as ligand-dependent transcription factors and stimulate cell growth in various tissues, including breast epithelial cells

(Mangelsdorf et al, 1995; McKenna & O'Malley, 2002; Tsai & O'Malley, 1994). Oestrogen receptor activity is also regulated by a plethora of post-translational modifications including phosphorylation, acetylation and methylation (Le Romancer et al, 2011). In addition, accumulating evidence indicates that oestrogens activate non-genomic pathways through a pool of conventional ER α located in the cytoplasm and/or at the plasma membrane (Hammes & Levin, 2007; Levin, 2009; Razandi et al, 2004). Although several partners for extranuclear ER α have been described in different cell types, the most conserved partners are PI3K and the tyrosine kinase Src (Castoria et al, 2001; Simoncini et al, 2000; Song et al, 2005). Besides this core complex, several adaptor scaffold proteins such as p130^{Cas} and MNAR (modulator of non-genomic activity of the oestrogen receptor) have also been found to be part of the complex (Barletta et al, 2004; Cabodi et al, 2004; Shupnik, 2004). After oestrogenic stimulation, the rapid formation of the protein complex triggers the activation of downstream signalling cascades involving the Ras/MAPK and Akt pathways (Castoria et al, 2001; Hammes & Levin, 2007). Mechanistically, we previously reported that methylation of ER α on arginine 260 by the arginine methyltransferase PRMT1 is a prerequisite for its association with Src, PI3K and the Focal Adhesion Kinase (FAK)

(1) Université de Lyon, Lyon, France

(2) Université Lyon 1, Lyon, France

(3) Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

(4) CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

(5) Centre Léon Bérard, Lyon, France

(6) Equipe Labellisée, La Ligue, France

(7) Pathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France

(8) Biostatistics Unit, Centre Léon Bérard, Lyon, France

(9) Department of Medical Oncology, Centre Léon Bérard, Lyon, France

*Corresponding author: Tel: +33 4 78 78 28 22; Fax: +33 4 78 78 27 20; E-mail: muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

†These authors contributed equally to this work.

as well as activation of its downstream effector Akt (Le Romancer et al, 2008, 2010). Using an antibody that specifically recognizes the methylated form of ER α (mER α), we have shown that this modification occurs in the cytoplasm of normal breast epithelial cells and is highly expressed in a subset of breast tumours (Le Romancer et al, 2008). Of note, the presence of mER α in the cytoplasm of tumour cells did not correlate with the clinical classification of ER α -positive or -negative tumours. This is because the population of ER α -positive cases included only tumours, which exhibited ER α nuclear staining. Our results thus suggested that oestrogen non-genomic signalling, which mirrors ER α methylation, occurs in normal breast tissue and could be deregulated in breast cancer. However, the existence of the oestrogen-mediated signalling complex remains a fundamental question to be clearly addressed.

For this purpose, we used Proximity Ligation Assay (PLA) technology to detect both ER α /PI3K and ER α /Src interactions in breast cancer specimens. Here, we show that the signalling complex is present in the cytoplasm of normal epithelial cells and highly expressed in some breast tumours. Of note, the amount of ER α /PI3K/Src correlates with both the level of ER α methylation and the activation of Akt, a crucial downstream target of this complex. Finally, we show that overexpression of the complex in a subset of invasive breast tumours is an independent marker of poor prognosis and associated with reduced disease-free survival (DFS). This opens new horizons for breast cancer treatment.

RESULTS

Detection of endogenous ER α /PI3K and ER α /Src interactions in human breast tumour cells

Castoria et al. reported that oestrogen rapidly triggers the interaction of ER α with Src as well as PI3K in MCF-7 cells and forming a complex involved in oestrogen non-genomic-induced cell proliferation (Castoria et al, 2001). This result has largely been confirmed by others in several breast cell lines (Cabodi et al, 2004; Fernando & Wimalasena, 2004) as well as in other tissues (Hisamoto et al, 2001). However, all of these results were obtained by immunoprecipitation in cell lines that did not allow the visualization of interactions between proteins. Therefore, the physiological relevance of this signalling pathway remains questionable. To date, immunofluorescence analysis of the complex has been impeded by the fact that only a small population of ER α interacts with Src and PI3K. To circumvent this problem, we used a newly developed technique, PLA. Using PLA, protein-protein interactions can be sensitively and specifically identified using pairs of proximity probes and detected by *in situ* circular amplification, with each red dot representing an interaction (Soderberg et al, 2006). We investigated the ER α /PI3K interaction in the human breast tumour cell line MCF-7 using a rabbit anti-ER α together with a mouse anti-p85 antibody. The ER α /Src interaction was detected using the same anti-ER α together with a mouse anti-Src antibody. Figure 1A shows that ER α interacted with PI3K and Src in the cytoplasm of MCF-7 cells as indicated by the presence

of red dots for both antibody pairs (panels a,b). No dots were detected using only one antibody (panels c-e) as confirmed by counting dots per 100 cells (Fig 1B, around 50 dots/cell vs. <5). Importantly, the number of red dots increased after 5 min of oestrogenic treatment, then decreased after 15 min. This confirmed that upon oestrogenic treatment, the formation of this complex is rapid and transitory (Fig 1C: compare panels a,b to panels c,d and e,f and Fig 1D). As expected, we observed a decrease in the interaction between ER α /PI3K and ER α /Src in MCF-7 cells upon tamoxifen treatment (Supporting Information Fig S1A and S1B) and ER α knockdown (Fig 1E-G), validating the specificity of the above results. In addition, we performed a set of controls to further validate the specificity of the PLA technology. We tested the interactions between ER α with two known ER α nuclear co-activators, SRC3 and p300 (Acevedo & Kraus, 2003). They were detected exclusively in the nucleus of MCF-7 cells as expected (Supporting Information Fig S2). We previously identified that FAK is also recruited into the complex (Le Romancer et al, 2008) as confirmed by others (Sanchez et al, 2010). Therefore, we studied the interaction of FAK with ER α by PLA. As seen in Supporting Information Fig S3, although FAK interacts with Src, we did not detect any red dots indicating an ER α /FAK interaction. This result is concordant with our previous data showing that the recruitment of FAK into the complex is mediated by its interaction with Src.

We previously showed that the formation of the ER α /PI3K/Src complex requires the methylation of ER α as well as the kinase activity of Src and PI3K (Le Romancer et al, 2008). Therefore, we performed PLA analysis either using PRMT1 knockdown cells or after the addition of PP1 (Src inhibitor) or LY294002 (PI3K inhibitor). PLA analysis confirmed these results with a significant decrease of red dots (Fig 2A-F). Furthermore, the group of Aurricchio found that a six-amino acid peptide (pYpep) that mimics the sequence around the phosphotyrosine residue in position 537 of the human ER α disrupts ER α /Src interaction and oestrogen-induced proliferation (Varricchio et al, 2007). Indeed, treatment with the phosphorylated peptide induced a notable disruption of the complex, visualized by both immunoprecipitation (Fig 2G) and PLA analysis (Fig 2H and I).

Finally, we confirmed the interactions between ER α /PI3K and ER α /Src using the ER α -positive cell lines CLB-SAV, ZR75.1 and Cama-1 as well as the ER α -negative cell line MDA-MB-231. Supporting Information Fig S4 shows that both complexes were present in the cytoplasm of CLB-SAV and ZR75.1 cells (panels a-d) but not in Cama-1 cells nor MDA-MB-231 cells (panels e-h). Formation of the complex was concordant with the methylation of ER α as we did not detect any oestrogen-induced methylation in either MDA-MB-231 or Cama-1 cells (Supporting Information Figures S4B-D).

All these *in vitro* data clearly validate the PLA technology as a powerful tool to analyse ER α /PI3K and ER α /Src interactions.

ER α interacts with PI3K and Src in normal breast samples

A crucial question about oestrogen non-genomic signalling concerns its physiological relevance. To approach this issue, we first investigated the presence of the ER α /Src/PI3K complex in three human normal breast samples obtained after

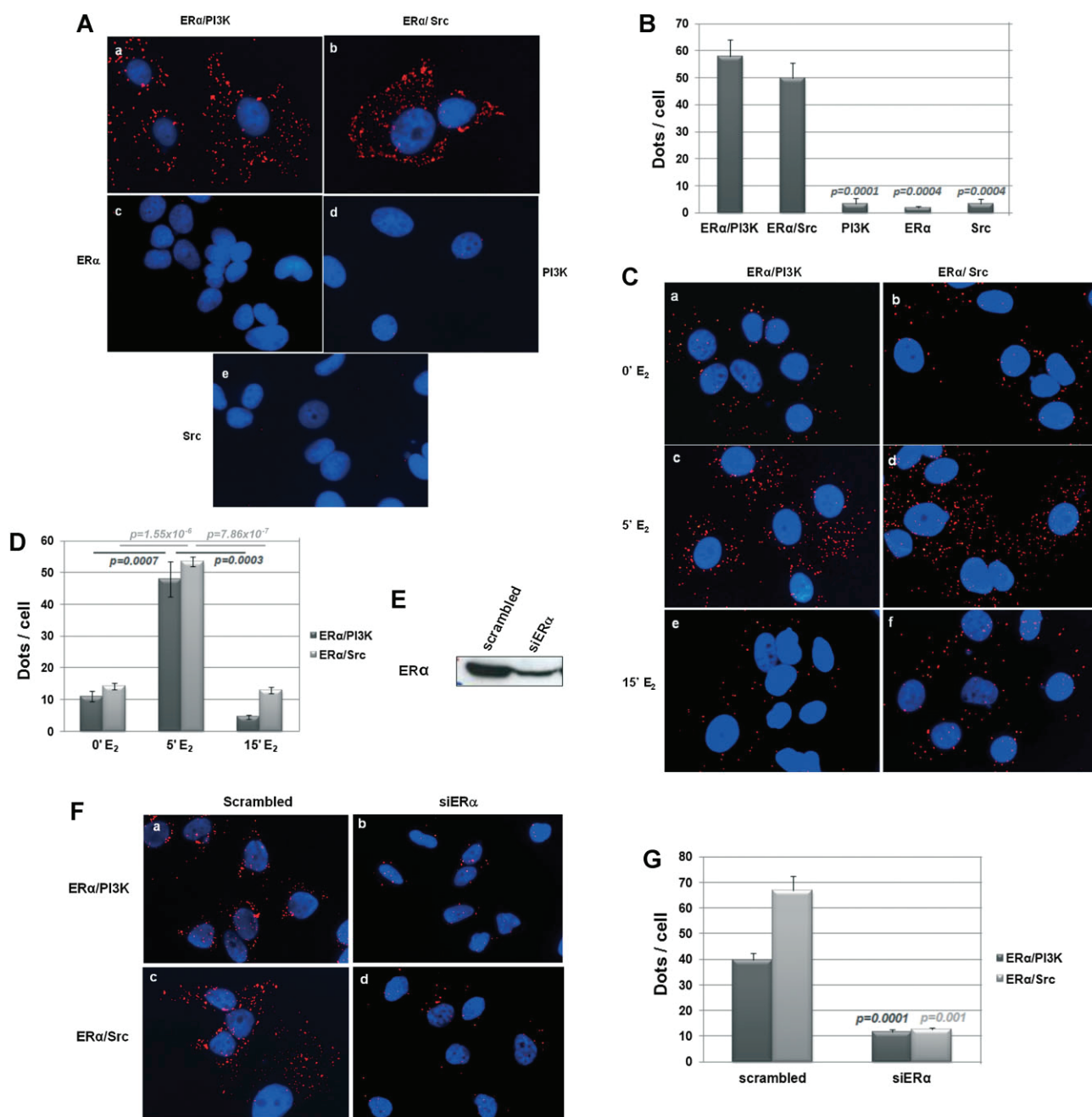


Figure 1. *In situ* PLA detection of endogenous ERα/PI3K and ERα/Src interactions in MCF-7 cells.

- A.** Oestrogen-deprived MCF-7 cells were incubated with E₂ 10⁻⁸ M for 5 min. After fixation, *in situ* PLA for ERα/PI3K (panel a) and ERα/Src dimers (panel b) was performed with ERα-, Src- and PI3K-specific antibodies. The detected dimers are represented by red dots. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj:X63). Control experiments were performed with single antibodies (panels c–e).
- B.** Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Materials and Methods Section. The mean ± SEM of four experiments is shown. *p*-value was determined by Student's *t*-test.
- C.** We analysed as in **A** the effect of E₂ treatment on interactions between ERα/PI3K and ERα/Src using MCF-7 cells incubated with vehicle (panels a,b) or with E₂ 10⁻⁸ M for 5 min (panels c,d) and for 15 min (panels e,f).
- D.** Quantification of the number of signals per cell was performed as described. The mean ± SEM of four experiments is shown. *p*-value was determined by Student's *t*-test.
- E.** MCF-7 cells transfected with control siRNA duplexes or with specific ERα siRNA duplexes were controlled for ERα expression by Western blot.
- F.** Then, ERα/PI3K and ERα/Src interactions were analysed by PLA. The nuclei were counterstained with DAPI (blue).
- G.** Quantification of the number of signals was performed as described above. The mean ± SEM of four experiments is shown. *p*-value was determined by Student's *t*-test.

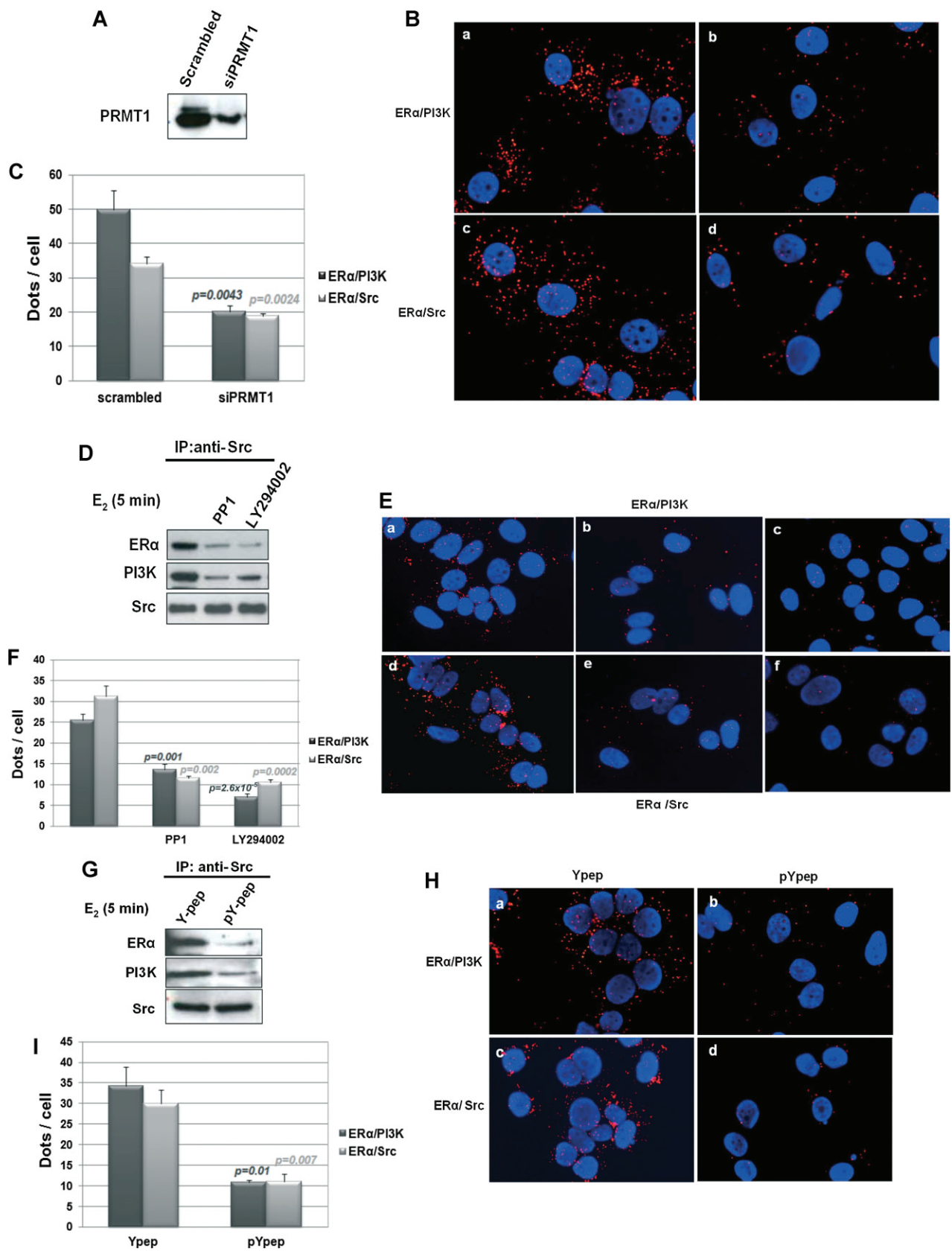


Figure 2.

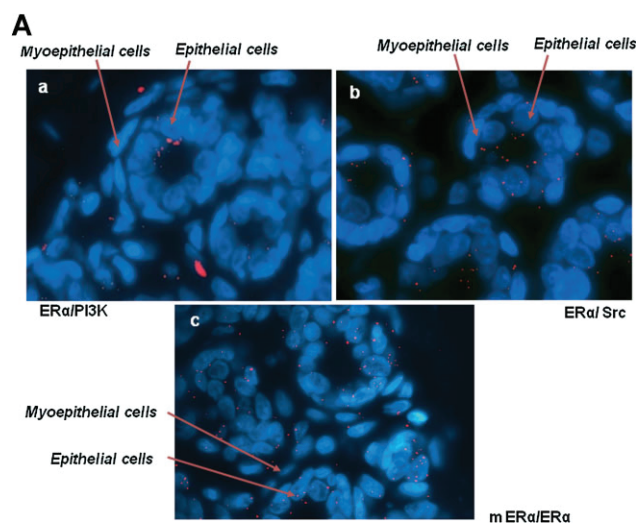
mammoplasty. Thus, we performed PLA experiments using the two previously described pairs of antibodies to study the ER α /Src and ER α /PI3K interactions. To correlate these interactions with the presence of methylated ER α , we detected mER α by PLA using rabbit anti-ER α together with the mouse anti-mER α antibody (mER α /ER α). As shown in Fig 3A, we detected ER α /PI3K (panel a), ER α /Src (panel b) and mER α /ER α expression (panel c) in the cytoplasm of epithelial but not myoepithelial cells. The quantification of red dots revealed a low level expression of the complex. This was expected as ER α is faintly expressed in normal breast epithelial cells. We obtained similar results for all three mammary samples (Fig 3B).

In human breast cancers, the interaction of ER α with both PI3K and Src correlates with ER α methylation and Akt activation

We next evaluated the presence of the ER α /PI3K and ER α /Src complexes as well as mER α /ER α expression in invasive breast tumours. The signal for each protein pair varied in intensity from null to a very strong signal. Figure 4 shows two examples of signals we obtained. Tumour #1 did not express the complex whereas Tumour #2 expressed high levels of complex. Of interest, mER α expression correlated with the presence of both ER α /Src and ER α /PI3K complexes as visualized by red dots localized in the cytoplasm of tumour cells.

Subsequently, the study was extended to include 175 invasive breast cancers in 5 tissue microarray blocks (TMA). To perform these highly scaled experiments, we used a different PLA kit, which allows the visualization of brown dots in bright field microscope. We also performed immunohistochemistry analysis using an anti-p-Akt antibody on the same tumour samples in order to confirm that ER α methylation triggers Akt activation. Results from these PLA experiments were quantified by counting at least 400 cells and expressed as the mean number of dots per cell as described in the Material and Methods Section (see Supporting Information Table S1).

Interestingly, when we performed a correlation analysis between the different markers, we found significant correlations between ER α /PI3K, ER α /Src interactions and mER α expression ($p < 0.001$; Table 1). This confirms our hypothesis that mER α is responsible for forming the complex. We also discovered



B

Figure 3. ER α /Src/PI3K complex expression in human normal breast tissue.

- A.** ER α /PI3K, ER α /Src interactions and ER α /mER α were detected with PLA on 3 formalin-fixed human mamoplasty samples. Here is an example of the results obtained on sample 1 for ER α /PI3K interaction (panel a), ER α /Src interaction (panel b) and ER α methylation (mER α /ER α , panel c).
- B.** Quantification of the number of dots/cell was performed on the three samples for each couple as described.

statistically significant correlations between each protein pair and P-Akt expression. Figure 5 illustrates representative results showing the high correlation between the expression of this signalling complex and the activation of its downstream effector Akt.

These data consistently demonstrate that ER α methylation is required for mediating the interaction of the oestrogen receptor with Src and PI3K, which propagates the signal to downstream

Figure 2. Regulation of ER α /PI3K and ER α /Src interactions in MCF-7 cells detected by PLA.

- A.** MCF-7 cells transfected with control siRNA duplexes or with specific PRMT1 siRNA duplexes were controlled for PRMT1 expression by Western blot.
- B.** We analysed by PLA ER α /PI3K (panels a,b) and ER α /Src dimers (panels c,d).
- C.** Quantification of the number of signals was performed as described. The mean \pm SEM of four experiments is shown. p -value was determined by Student's t -test.
- D.** MCF-7 cells, treated or not with PP1 (5 μ M) or LY294002 (20 μ M) 15 min before E $_2$ treatment, were incubated with the vehicle or with E $_2$ for 5 min. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Src and blotted with indicated antibodies.
- E.** ER α /PI3K (panels a–c) and ER α /Src (panels d–f) interactions were analysed by PLA in cells treated as described above.
- F.** Quantification of the number of signals was performed for each couple as described. The mean \pm SEM of four experiments is shown. p -value was determined by Student's t -test.
- G.** MCF-7 cells were incubated with 1 nM of a peptide mimicking hER α 536–541 containing Y537 (Y-pep) or the corresponding phosphorylated peptide (pY-pep) 30 min before E $_2$ treatment. Then, cell lysates were immunoprecipitated with anti-Src and blotted with indicated antibodies.
- H.** From the same experiment, ER α /PI3K (panels a,b) and ER α /Src interactions (panels c,d) were analysed by PLA.
- I.** Quantification of the number of signals was performed as described. The mean \pm SEM of four experiments is shown. p -value was determined by Student's t -test.

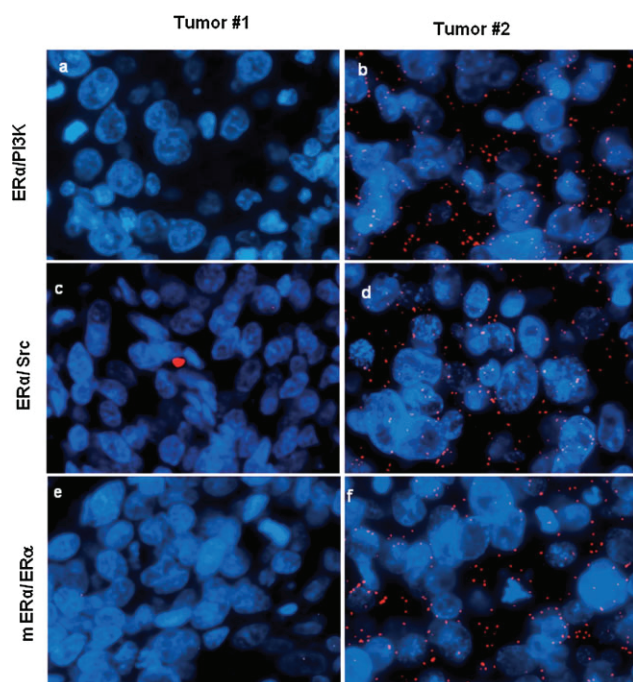


Figure 4. ERα/Src/PI3K complex expression in human tumoral breast samples. ERα/PI3K (panels a,b), ERα/Src (panels c,d) and ERα/mERα (panels e,f) expression were detected with PLA on two formalin-fixed paraffin-embedded breast tumours. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). The experiments were performed in three serial sections from the same tumour (Obj X63).

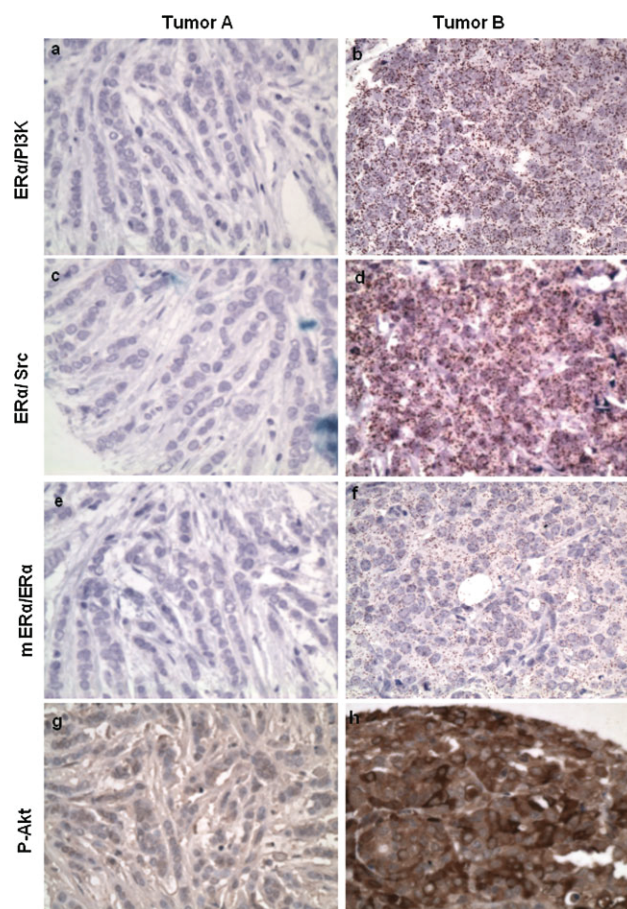


Figure 5. ERα/Src/PI3K complex and p-Akt expression in TMA revealed by bright field PLA. For each tumour, we analysed by PLA the levels of ERα/PI3K (panels a,b), ERα/Src complexes (panels c,d) ERα/mERα expression (panels e,f) and P-Akt expression by immunohistochemistry (panels g,h). The experiments were performed in four serial sections from the same tumour.

transduction cascades. Overexpression of mERα and the signalling complex can lead to the hyperactivation of Akt.

High ERα/Src and ERα/PI3K interactions are associated with clinical factors of poor prognosis

Based on the quantification of dots per cell for each protein couple, we analysed the association between their expression and clinical parameters for 175 breast tumours.

For the expression of ERα/Src, we did not find any association with the status of ERα, PR or HER2. However, age >50 years and menopausal status were significantly associated with a low expression of ERα/Src (respectively 80% and 76% vs. 58% and 55% of patients with a high expression of ERα/Src, $p=0.003$ and $p=0.006$). ERα/Src expression was also associated with lymph node involvement (42% of patients with a low expression of ERα/Src had lymph node involvement vs. 52% of patients with a high

expression of ERα/Src, $p=0.038$; Table 2). Thus, a high expression of ERα/Src was associated with less favourable prognostic factors.

Regarding ERα/PI3K expression, we did not find any association with ERα or PR expression. However, a high expression of ERα/PI3K was associated with tumours overexpressing HER2 (25% of tumours with a high expression of ERα/PI3K overexpressed HER2 vs. 10% of tumours with a low expression, $p=0.019$). Moreover, high expression of ERα/PI3K was associated with tumour grade, with more tumours presenting grade 2 or 3 when ERα/PI3K was highly expressed ($p=0.014$; Table 3).

We found that high expression of mERα/ERα was significantly associated with the youngest people (<50 years old), premenopausal status, higher grade SBR and ERα expression (Supporting Information Table S2).

Altogether, these data strongly suggest that oestrogen non-genomic signalling is associated with common poor prognostic factors for breast cancer patients (Weigel & Dowsett, 2010).

Table 1. Correlation analysis between the different markers and p-Akt

| | | | |
|----------|---------|----------|---------|
| ERα/PI3K | 0.79*** | 0.75*** | 0.29*** |
| ERα/Src | | 0.73*** | 0.30*** |
| | | ERα/mERα | 0.33*** |
| | | | P-Akt |

Correlation studies were performed using the Pearson's coefficient between the couples (ERα/PI3K, ERα/Src and ERα/mERα) and p-Akt. *** $p < 0.001$.

Table 2. Distribution of clinical parameters according to groups of ER α /Src expression

| | Duolink ER α /Src | | | | Test (<i>p</i>) |
|---------------------------------------|--------------------------|------|---------------------|------|----------------------|
| | 0–4 (<i>N</i> = 79) | | >4 (<i>N</i> = 96) | | |
| | N | % | N | % | |
| Age at diagnosis (years) | | | | | χ^2 (0.003) |
| <50 | 16 | 20.3 | 40 | 41.7 | |
| \geq 50 | 63 | 79.7 | 56 | 58.3 | |
| Menopause | | | | | χ^2 (0.006) |
| ND | 1 | | 2 | | |
| No | 19 | 24.4 | 42 | 44.7 | |
| 1 Yes | 59 | 75.6 | 52 | 55.3 | |
| Tumour size (mm) | | | | | χ^2 (0.852) |
| <20 mm | 31 | 39.2 | 39 | 40.6 | |
| \geq 20 mm | 48 | 60.8 | 57 | 59.4 | |
| Histological grade (SBR) | | | | | χ^2 (0.505) |
| 1 | 17 | 21.5 | 15 | 15.6 | |
| 2 | 33 | 41.8 | 39 | 40.6 | |
| 3 | 29 | 36.7 | 42 | 43.8 | |
| Lymph node involvement | | | | | Fisher Exact (0.038) |
| NO | 34 | 43.0 | 42 | 43.8 | |
| Micro metastasis | 12 | 15.2 | 4 | 4.2 | |
| Macro metastasis | 33 | 41.8 | 50 | 52.1 | |
| Lympho-vascular invasion | | | | | χ^2 (0.119) |
| Yes | 31 | 39.2 | 49 | 51.0 | |
| No | 48 | 60.8 | 47 | 49.0 | |
| Oestrogen receptor: % marked cells | | | | | χ^2 (0.824) |
| ND | 1 | | 0 | | |
| <10% | 19 | 24.4 | 22 | 22.9 | |
| \geq 10% | 59 | 75.6 | 74 | 77.1 | |
| Progesterone receptor: % marked cells | | | | | χ^2 (0.834) |
| ND | 1 | | 0 | | |
| <10% | 28 | 35.9 | 33 | 34.4 | |
| \geq 10% | 50 | 64.1 | 63 | 65.6 | |
| HER2 status | | | | | χ^2 (0.935) |
| ND | 9 | | 1 | | |
| 0/+/++FISH– | 60 | 85.7 | 81 | 85.3 | |
| ++FISH+/+++ | 10 | 14.3 | 14 | 14.7 | |

Clinical parameters (age at diagnosis, tumour size, menopausal status, lymph node involvement, SBR grading and hormonal expression) were analysed for the 175 patients included in the TMA study. Association between clinical characteristics and the level of ER α /Src interaction (cut off at 4 dots/cell) was determined using χ^2 test or Fisher's exact test.

Survival analysis and predictive value of ER α /Src and ER α /PI3K interactions

We next investigated how ER α /Src and/or ER α /PI3K expression was associated with patient outcomes. Regarding ER α /Src, high expression of this pair was associated with a decreased DFS (Log-Rank test, $p=0.044$; Fig 6A). Furthermore, within the subgroup of ER α -positive tumours, a high expression of ER α /Src was still associated with a reduced DFS ($p=0.032$; Fig 6B). For ER α -negative tumours, the number of patients was likely not sufficient to make solid conclusions (Fig 6C). In multivariate analysis, high expression of ER α /Src remained an independent prognostic factor [HR = 1.86, 95% CI (1.01–3.42), $p=0.046$] adjusted to lymph node involvement [HR = 1.93, 95% CI (1.05–3.56), $p=0.035$; Table 4]. Of note, parameters like SBR grade, ER α expression and lymph node involvement were not kept as independent prognostic factors in the final model. In terms of overall survival, there was no statistical difference between

tumours with high and low expression of ER α /Src ($p=0.23$; Supporting Information Fig S5).

We made similar observations for the ER α /PI3K interaction. For all patients, we found no statistical association with either DFS or OS ($p=0.096$ and $p=0.309$, respectively), even though a tendency can be observed regarding DFS (Fig 7A and Supporting Information Fig S6). However, for patients with ER α -positive tumours, expression of ER α /PI3K was a prognostic factor for DFS, with a worse prognosis for patients with tumours highly expressing ER α /PI3K, (Log-Rank test, $p=0.049$; Fig 7B). As for the ER α /Src interaction, the number of patients with ER α -negative tumours was too small to allow solid conclusions (Fig 7C). In multivariate analysis, high expression of ER α /PI3K was found to be linked with DFS [HR = 1.89, 95% CI (1.04–3.42), $p=0.037$] adjusted to lymph node involvement [HR = 2.07, 95% CI (1.15–3.72), $p=0.015$; Table 5].

Table 3. Distribution of clinical parameters according to groups of ER α /PI3K expression

| | Duolink ER α /PI3K | | | | Test (p) |
|---------------------------------------|---------------------------|------|-------------|------|---------------------------|
| | 0–7 (N = 125) | | >7 (N = 50) | | |
| | N | % | N | % | |
| Age at diagnosis (years) | | | | | χ^2 (0.720) |
| <50 | 39 | 31.2 | 17 | 34.0 | |
| \geq 50 | 86 | 68.8 | 33 | 66.0 | |
| Menopause | | | | | χ^2 (0.925) |
| ND | 3 | | 0 | | |
| No | 43 | 35.2 | 18 | 36.0 | |
| Yes | 79 | 64.8 | 32 | 64.0 | |
| Tumour size (mm) | | | | | χ^2 (0.733) |
| <20 mm | 49 | 39.2 | 21 | 42.0 | |
| \geq 20 mm | 76 | 60.8 | 29 | 58.0 | |
| Histological grade (SBR) | | | | | χ^2 (0.014) |
| 1 | 29 | 23.2 | 3 | 6.0 | |
| 2 | 45 | 36.0 | 27 | 54.0 | |
| 3 | 51 | 40.8 | 20 | 40.0 | |
| Lymph node involvement | | | | | Fisher exact (0.205) |
| NO | 56 | 44.8 | 20 | 40.0 | |
| Micro metastasis | 14 | 11.2 | 2 | 4.0 | |
| Macro metastasis | 55 | 44.0 | 28 | 56.0 | |
| Lympho-vascular invasion | | | | | χ^2 (0.195) |
| Yes | 61 | 48.8 | 19 | 38.0 | |
| No | 64 | 51.2 | 31 | 62.0 | |
| Oestrogen receptor: % marked cells | | | | | χ^2 (0.758) |
| ND | 1 | | 0 | | |
| <10% | 30 | 24.2 | 11 | 22.0 | |
| \geq 10% | 94 | 75.8 | 39 | 78.0 | |
| Progesterone receptor: % marked cells | | | | | χ^2 (0.386) |
| ND | 1 | | 0 | | |
| <10% | 41 | 33.1 | 20 | 40.0 | |
| \geq 10% | 83 | 66.9 | 30 | 60.0 | |
| HER2 status | | | | | χ^2 (0.019) |
| ND | 9 | | 1 | | |
| 0/+/++FISH– | 104 | 89.7 | 37 | 75.5 | |
| ++FISH+/+++ | 12 | 10.3 | 12 | 24.5 | |

Clinical parameters (age at diagnosis, tumour size, menopausal status, lymph node involvement, SBR grading and hormonal expression) were analysed for the 175 patients included in the TMA study. Association between clinical characteristics and the level of ER α /PI3K interaction (cut off at 7 dots/cell) was determined using χ^2 test or Fisher's exact test. Significant correlations are highlighted in bold characters.

We did not find an association between ER α methylation and patient outcomes as measured by the pair mER α /ER α (Supporting Information Fig S7).

DISCUSSION

Our results have enabled us to reach several relevant conclusions. Firstly, we have formally demonstrated the presence of the signalling complex described to mediate the rapid action of oestrogen in breast cancer within human breast tissues. This rules out any controversy surrounding the physiological evidence of oestrogen extranuclear action (Warner & Gustafsson, 2006). In fact, we have been able to directly show the association of ER α with its complex partners PI3K and Src in the cytoplasm of mammary epithelial cells. Signals were faint in normal samples and strong in some breast tumour cancers. Furthermore, we report that the

presence of methylated ER α statistically correlates with the capacity of ER α to interact with both its partners, PI3K and Src. The precise quantification of these *in situ* interactions has been possible using PLA technology. This allowed the detection and quantification of protein–protein interactions by counting the discrete spot-like signals, each representing one interaction. Since the first step of rapid oestrogen signalling is the formation of a complex containing ER α /Src/PI3K, we evaluated ER α /PI3K and ER α /Src interactions *in situ*. We validated the specificity of this approach by setting up experimental conditions in MCF-7 cells and confirmed by PLA the *in vitro* data on the formation and regulation of the complex ER α /Src/PI3K (Figs 1 and 2, Supporting Information Figs S1–S4). Indeed, we confirmed that oestrogen treatment triggers the rapid and transient interaction of ER α with PI3K and Src. Both interactions increased significantly after 5 min, then decreased after 15 min of E₂ treatment (Fig 1C and D).

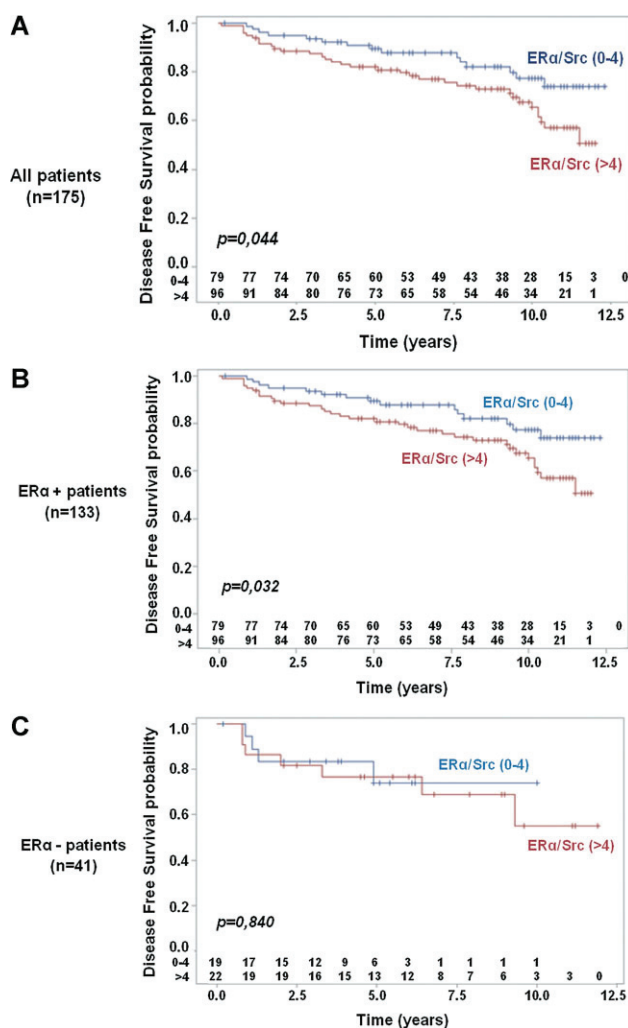


Figure 6. Kaplan–Meier estimates of DFS by ER α /Src expression groups. A. Global population (cut off at four dots per cell). B. Sub-population of ER-positive cases. C. Sub-population of ER-negative cases.

Subsequently, we analysed the expression of the complex in several human breast cancer cell lines and demonstrated a concordance between the levels of ER α methylation and both ER α /PI3K and ER α /Src interactions (Supporting Information Fig S4). This confirmed the data we obtained in MCF-7 cells

| Variables | Hazard Ratio | IC95% | p-value |
|--------------------------|--------------|-----------|---------|
| Duolink ER α /Src | | | |
| 0–4 | 1 | – | |
| >4 | 1.859 | 1.01–3.42 | 0.046 |
| Lymph node involvement | | | |
| No | 1 | – | |
| Yes | 1.929 | 1.05–3.56 | 0.035 |

Hazard ratios for high ER α /Src interaction (score: 0–4) relative to low ER α /Src interaction (score: >4) are shown and for lymph node involvement.

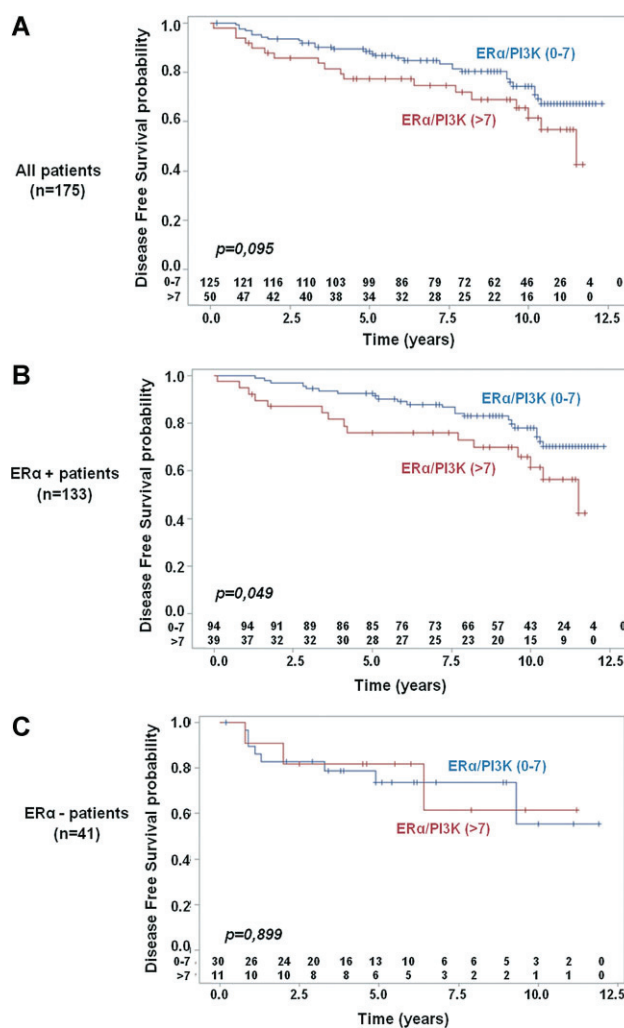


Figure 7. Kaplan–Meier estimates of DFS by ER α /PI3K expression groups. A. Global population (cut off at seven dots per cell). B. Sub-population of ER-positive cases. C. Sub-population of ER-negative cases.

demonstrating that receptor methylation is a prerequisite for the formation of the complex.

We have used PLA technology to confirm the presence of the ER α /PI3K/Src complex in the cytoplasm of tumoral cells in a cohort of 175 invasive breast cancers. The precise quantification

| Variables | Hazard ratio | IC95% | p-value |
|---------------------------|--------------|-----------|---------|
| Duolink ER α /PI3K | | | |
| 0–7 | 1 | – | |
| >7 | 1.885 | 1.04–3.42 | 0.037 |
| Lympho-vascular invasion | | | |
| No | 1 | – | |
| Yes | 2.068 | 1.15–3.72 | 0.015 |

Hazard ratios for high ER α /PI3K interaction (score: 0–7) relative to low ER α /PI3K interaction (score: >7) are shown and for lymph node involvement.

of the signals obtained for each protein pair (ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /mER α) clearly shows that formation of the complex was highly increased in a subset of breast cancers. For example, we measured 0–3 dots per cell for the ER α /Src interaction in normal cells, compared to up to 21 dots per cell in tumour samples. We made the same observations for the other two protein pairs (compare Fig 3B with Supporting Information Table S1). The analysis of ER α /Src interaction in 175 breast tumour samples showed that 55% of breast tumours highly express this protein pair (Table 2). Our result is different from those of Welsh et al (Welsh et al, 2012). They analysed ER α cytoplasmic expression by quantitative immunofluorescence on 3200 tumour samples and found that only 1.5% of tumours express cytoplasmic ER α . This discrepancy is probably due to a lack of sensitivity and highlights the use of the PLA technology as a powerful tool to measure oestrogen non-genomic signalling.

Moreover, our work supports the concept that in breast tumours, nuclear and non-nuclear oestrogen signalling can act independently. In fact, we found the ER α /Src/PI3K complex in tumours negative for nuclear ER α . In our cohort of 175 patients, 22 (54%) of the 41 ER α -negative tumours expressed a high level of ER α /Src (Table 2). This is in agreement with our previous analysis of ER α methylation in a different cohort of 164 breast tumours where we found that 53% of ER α -negative tumours expressed hypermethylated ER α (Le Romancer et al, 2008). Kumar et al also found ER α expression in the cytoplasm of tumours classified as ER α -negative. They explained this unusual localization by the sequestration of ER α into the cytoplasm through a natural variant of MTA1, MTA1s (metastasis-associated antigen 1 short form; Kumar et al, 2002). However, they did not demonstrate that a cytoplasmic pathway was activated in these tumours. We have confirmed the association of ER α methylation and its interaction with PI3K and Src in line with our previous results obtained in cellular models. This suggests that ER α methylation is a key step for ER α /Src/PI3K complex formation. Interestingly, the formation of the complex correlates with the activation of Akt as measured by the status of Akt phosphorylation. This strongly indicates that in breast tissues, oestrogens activate cytoplasmic phosphorylation cascades by triggering the methylation of ER α and the recruitment of Src and PI3K. This finding introduces a new concept: the rapid oestrogen pathway is operative *in vivo* and deregulated in a subset of breast cancers.

Our second important result shows that the association level of ER α with both Src and PI3K correlates with other prognostic factors, such as high SBR grade and lymph node involvement. Thereby, this strongly suggests that activation of the cytoplasmic signalling pathway could constitute a marker of tumour aggressiveness. The association between the ER α /Src interaction and lymph node metastasis is particularly interesting and could involve FAK activity as we have demonstrated that FAK is also recruited with ER α /Src/PI3K upon oestrogenic stimulation (Le Romancer et al, 2008).

Due to the major role that ER α plays in the development and progression of breast cancer, the oestrogen signalling pathway has been studied in depth. Current endocrine

therapies for breast cancer are mainly based on targeting the ER α signalling pathway: reducing oestrogen abundance with aromatase inhibitor (Baum et al, 2002; Johnston & Dowsett, 2003), antagonizing ER α function with tamoxifen and raloxifene (Jensen & Jordan, 2003) or down-regulating ER α expression with fulvestrant (MacGregor & Jordan, 1998). However, resistance to endocrine therapies is one of the major barriers to the successful treatment of breast cancer (Musgrove & Sutherland, 2009; Yamashita, 2008). There is a real need to find markers predicting resistance to treatment. Currently, ER α expression in the nucleus is the only known biomarker of response to endocrine therapy. As a consequence, non-genomic ER α signalling has never been assessed in clinical practice.

Aberrant activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway has been found in many types of cancer and thus plays a role in breast cancer proliferation and anti-cancer resistance (Ghayad & Cohen, 2010). It is clear that activation of this signalling pathway triggers a cascade of biological events such as cell growth, proliferation, survival and migration, which contribute to tumour progression. Therefore, this pathway is an attractive target for the development of anti-cancer molecules and several kinase inhibitors have already been developed. Several of these inhibitors are currently under clinical evaluation (Ghayad & Cohen, 2010). The tyrosine kinase Src has also been considered as a potential target and Src inhibitors like dasatinib or bosutinib have been tested in phase II clinical trials (Araujo & Logothetis, 2010). However, so far, the effects have been quite disappointing. In fact, dasatinib used as a single agent has limited activity in patients with triple-negative breast cancer (TNBC; Finn et al, 2011) or patients with heavily treated metastatic breast cancer (Campone et al, 2012) and it advances ER α -positive tumours. However, *in vitro* studies show that combining anti-oestrogen and Src inhibitor enhances growth inhibition (Chen et al, 2011). Moreover, clinical trials are ongoing to combine dasatinib with other therapies (Mayer & Krop, 2010). However, even if clinical studies give satisfactory results, there remains a real need to identify biomarkers that will predict which patients could benefit from these inhibitors either alone or in combination.

We can speculate that the deregulation of oestrogen non-genomic signalling may open up new perspectives for anti-cancer treatment strategy. However, our patient population was small and usual prognostic factors (such as tumour size) were not found to be significant in the current retrospective analysis. Independent validation is required and this can be done in the context of randomized clinical trials with endocrine therapy where the oestrogen non-genomic signalling can be assessed retrospectively. Furthermore, our work suggests that the non-genomic signalling pathway may be taken into account to optimize targeted therapies. In the metastatic setting, as described above, PI3K and/or Src appear to be promising targets for treatment. We can thus imagine targeting the entire ER α /Src/PI3K complexes. The disruption of the complex containing mER α /Src/PI3K has already been shown to decrease cell proliferation. Consistent with this hypothesis, the work by Auricchio et al has shown that disrupting the ER α /Src

interaction with a peptide impairs complex formation and the proliferation of tumour cells both *in vitro* and in xenografted mice (Varricchio et al, 2007). We speculate that combining endocrine therapies with Src inhibitors and/or PI3K inhibitors based on the level of ER α /Src or ER α /PI3K interactions may be clinically relevant. This concept has to be validated in large prospective clinical studies.

For TNBC, which account for approximately 15% of all breast cancers (Foulkes et al, 2010) and for which specific targets are lacking, determining which pathways are activated is important. When we analysed the DFS of patients with ER α -negative tumours according to ER α /Src intensity staining in a Duolink experiment (0 vs. 1–2), we identified a subpopulation of patients that did not display oestrogen non-genomic signalling and who did not relapse (Supporting Information Fig S8). However, few patients do not express ER α /Src ($n=10$ vs. $n=31$ patients with intensity >0) and the difference is not statistically significant ($p=0.074$). For patients with tumours expressing ER α /Src, we assume that this complex may become a new target for treatment. Again, this assumption has to be validated in a prospective clinical trial.

In summary, this work is proof of concept that the oestrogen non-genomic pathway, represented by the formation of the ER α /Src/PI3K protein complex, potentially constitutes a novel tumour biomarker to predict survival and/or response to targeted agents. These encouraging results raise the interest for further clinical studies with large patient populations. We thus planed to test the effects of combining endocrine therapy plus kinase inhibitors such as PI3K/mTor inhibitors or Src inhibitors in preclinical studies as well as in clinical trials.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Transfections

MCF-7, CLB-SAV, MDA-MB-231 and ZR75-1 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% non-essential amino acids. Cama-1 cells were maintained at 37°C in RPMI supplemented with 10% serum. CLB-SAV is an epithelial cell line established by C. Caux (Centre Leon Berard, Lyon, France) from ascitic fluid of a 58-year old patient with lobular breast carcinoma. We have already shown that this cell line expresses ER α and mER α (Le Romancer et al, 2008). ZR-75 and Cama-1 express ER α although MDA-MB-231 does not express the receptor (Supporting Information Fig S4C).

To study the effect of hormones on ER α methylation, the cells were treated for different times with E₂ or tamoxifen (Sigma). When stated, MCF-7 cells were treated with Src inhibitors PP1 or with PI3K inhibitor LY 294002 (Calbiochem).

The siRNA sequence targeting PRMT1 has already been described (Le Romancer et al, 2008). The siRNA sequences targeting ER α correspond to the coding regions 854–872 (siER α 1) and 1137–1154 (siER α 2) and have been mixed before transfection.

Antibodies

Antibodies are listed in Table 6A and B.

Table 6. List of used antibodies

| A: Antibodies for PLA analysis | | | | |
|------------------------------------------------------------|------------------------|---------|----------|------------------|
| Antibodies | References | Species | Dilution | |
| ER α (1D5) | 7047 (Dako) | Mouse | 1/50 | |
| ER α (HC20) | Sc-542 (Santa Cruz) | Rabbit | 1/75 | |
| PI3K p85 | Ab22653 (Abcam) | Mouse | 1/30 | |
| Src (B12) | Sc-8056 (Santa Cruz) | Mouse | 1/150 | |
| mER α | Home made | Mouse | 1/50 | |
| p300 (NM11) | Sc-32244 (Santa Cruz) | Mouse | 1/100 | |
| SRC3 | Sc-13066 (Santa Cruz) | Rabbit | 1/50 | |
| FAK (A17) | Sc-557 (Santa Cruz) | Souris | 1/50 | |
| B: Antibodies for immunoprecipitation and Western blotting | | | | |
| Antibodies | References | Species | Dilution | IP |
| | | | | Western Blotting |
| mER α | Home made | Mouse | | 1 μ g |
| ER α (60C) | #04-820 (Millipore) | Rabbit | 1/1000 | |
| PRMT1 | #24-333 (Upstate) | Rabbit | 1/4000 | |
| PI3K p85 | #06-195 (Upstate) | Rabbit | 1/9000 | |
| c-Src (B12) | Sc-8056 (Santa Cruz) | Mouse | | 1 μ g |
| Src (36D10) | #2109 (Cell signaling) | Rabbit | 1/1000 | |

Immunoprecipitation and Western blotting

After treatment, cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% deoxycholate) supplemented with protease inhibitor tablets (Roche Molecular Biochemicals) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM β -glycerophosphate). Protein extracts were incubated with primary antibodies overnight at 4°C with shaking. Protein A-agarose or Protein L-agarose beads were added and the mixture was incubated 2 h at 4°C then washed three times with lysis buffer. After separation on SDS-PAGE, proteins were analysed by Western blotting.

Human breast cancer samples collection

The tumours from 175 CLB patients with invasive non-metastatic breast cancer whose clinical and biological data were available from the regularly updated institutional database were analysed. Written informed consent was obtained from each patient and the study protocol was approved by the institutional ethics committee. Patients's characteristics are presented in Supporting Information Table S3. Median age was 55 (range 27–87) and the majority of patients were post-menopausal (65%). In our study, tumours exhibiting less than 10% of ER positive cells qualify for ER negative tumours. The patient follow up was performed as routine practice.

Immunohistochemistry

Paraffin embedded tumours tissue fixed in Formalin were used for analysis. The pathologist selected representative areas from breast invasive carcinomas. Triplicates from each tumour were inserted in a TMA block which contained 40 tumours. Five TMA (200 tumours) were analysed. The blocks containing invasive carcinoma were serially sectioned at a thickness of 4 μ m. After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled in 10 mM citrate buffer pH6 using a water bath at 97°C for 40 min.

For blocking endogenous peroxidases, the slides were incubated in 5% hydrogen peroxide in sterile water. The slides were then incubated at

room temperature for 1 h with the anti-p-Akt monoclonal rabbit antibody (Ref: 2118.1, Epitomics, Burlingame, California) diluted at 1/50. After rinsing in Phosphate Buffer Saline, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin peroxidase conjugate (Envision Flex kit Ref: K800021-2, Dako, Trappes, France). Bound antibody was revealed by adding the substrate 3,3'-diamino benzidine. Sections were counterstained with hematoxylin.

Proximity ligation assay

This innovative technology developed by Olink Bioscience (Sweden) allows visualizing protein/protein interactions *in situ* and has been firstly published in 2006 (Soderberg et al, 2006).

Fluorescence revelation

MCF-7 cells (9.5×10^5), CLB-SAV cells (20×10^5), MDA-MB-231 cells (10×10^5), Cama-1 cells (10×10^5) and ZR75-1 cells (10×10^5) were grown on coverslips into 12-well plates. Cells were fixed in methanol for 2 min, washed twice in PBS. For tumours analysis, blocks containing breast tumours of 4 μm thick sections were cut, deparaffinized and subjected to antigen retrieval by water bath in citrate buffer (pH 6.0) during 40 min, and at rest during 20 min. Then, the slides were treated according to the manufacturer's instructions (Duolink II Fluorescence, Olink Bioscience, Sweden). Firstly, the samples were saturated using the blocking solution, then different couples of primary antibodies (rabbit and mouse in our case) were incubated 1 h at 37°C. After two washes in PBS, the PLA minus and plus probes (containing the secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides) were added and incubated 1 h at 37°C. The next step allows the ligation of oligonucleotides if the two proteins are in close proximity thanks to the ligase during an incubation of 30 min at 37°C. Then, after two washes, the addition of nucleotides and polymerase, allows amplification by rolling-circle amplification (RCA) reaction using the ligated circle as a template during an incubation of 100 min at 37°C. The amplification solution also contains fluorescently labelled oligonucleotides that hybridize to the RCA product. Then, the samples were let drying at room temperature in the dark and were mounted with Duolink II Mounting Medium containing Dapi, then analysed on fluorescence microscope.

Bright field revelation

For TMA analysis, we used another revelation kit (Duolink II Brightfield) that allows detecting the signal by colorimetry under visible light. The first step is to avoid peroxidase quenching incubating the samples 5 min at room temperature, with a hydrogen peroxide solution. The following steps are identical to what was described before. For the detection, the probes are labelled with horseradish peroxidase after two washes in high purity water; nuclear staining solution is added on slides and incubated 2 min at room temperature. After washing the slides 10 min on running tap water, the samples were dehydrated in ethanol, then in Xylene solution. Samples were mounted in non-aqueous mounting medium and then analysed with a Bright field microscope.

Image acquisition and analysis

The hybridized fluorescent slides were viewed under a Leica DM6000B microscope. Images were acquired under identical conditions at objective X63. On each samples, 100 cells were counted. Analyses and quantifications of these samples were performed using Image J

software (free access). This software allows counting dots on 8 bits image. The plugin "Counter cells" allows analyzing cells number.

The hybridized Bright field slides were viewed under a Leica DMLB microscope. Images on three independent zones of each tumour on TMA were acquired under identical conditions at objective X40. On each tumour, 500 tumorous cells were counted. We have done the analysis on TMAs blocks which include three cores of 600 μm for each tumour. In fact, each core is obtained in a different area of the tumour so that we try to take in account tumour heterogeneity. For PLA assessment, we make an average of the staining while counting the three cores. We do not choose focal areas on the cores. In the vast majority of our cases, a homogenous staining within the three cores was observed except for ten tumours. In these cases, the average of staining obtained from the three cores was used.

Thereafter, analyses and quantifications of these samples were performed using Duolink ImageTool software (developed by Olink Bioscience)

Statistical analysis

Correlation analysis

Correlations between the three biomarkers were studied. Furthermore, correlations between each couple (ER α /Src, ER α /PI3K, ER α /mER α expression) and p-Akt were also performed. The software produces a graph which represents the correlation between each variable 2 by 2. The Pearson's correlation coefficient were presented and the stars identify its significance threshold (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Descriptive analysis

Thanks to concertation between clinicians and biologists, thresholds were defined to distinguish in an optimal way high and low expression of ER α /Src ($\leq 4 / > 4$ dots per cells), ER α /PI3K ($\leq 7 / > 7$) and ER α /mER α ($\leq 3 / > 3$). Distribution of clinical parameters (cancer subtype, clinical, histological and immunohistochemical data) was compared between ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /mER α expression groups, using Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test. Same comparisons were made according to intensity levels but only results about dots per cells are presented in this article.

Survival analysis

Overall survival defined as time from diagnosis to death or date of last follow-up and DFS defined as time from diagnosis to death or relapse or date of last follow-up (for censored patients) were studied.

Survival distributions were estimated by Kaplan–Meier method and compared between expression's level groups using the Log-Rank test. To evaluate a possible relationship between DFS and ER α /Src expression, univariate Cox proportional hazard regression models were built by considering ER α /Src expression and some covariates, approved to be prognostic of DFS (tumour size, lymph node status, RE, RP, HER2 status and SBR grade). All interactions between variables (significant at 20%) were tested and only significant ones ($p \leq 0.05$) were entered in the initial multivariate Cox model in addition to variables statistically significant in univariate analysis at 20% level. A backward manual selection procedure was used to lead to the final model by removing non-significant variables ($p > 5\%$). Similar DFS study was achieved with ER α /PI3K marker.

The Paper explained

PROBLEM:

At breast cancer diagnosis, only patients expressing ER α in the nucleus (classified ER α -positive) are treated by endocrine therapy and unfortunately, some patients die after developing resistance to the treatments. However, a few papers have shown that ER α could be present in the cytoplasm of breast tumours. Furthermore, in cellular models, it has been well established that oestrogen activates extranuclear pathways through the recruitment of ER α /Src/PI3K and activation of downstream kinases as Akt. Our lab has shown that arginine methylation of ER α is a prerequisite for non-genomic signalling triggering association of ER α with Src and PI3K in breast cancer cells. The aim of this work was to assess whether oestrogen non-genomic signalling occurs in human breast tumours and if this signalling pathway could constitute a new therapeutic target.

RESULTS:

To approach oestrogen non-genomic signalling *in vivo*, we studied ER α interaction with Src and PI3K using the technology of PLA that allows detecting protein–protein interactions *in situ*. First, we were able to recapitulate the data about the complex formation containing ER α /Src/PI3K that were obtained with

other techniques. We then investigated oestrogen non-genomic signalling in breast tumours. We found that ER α interacts weakly with Src and PI3K in human normal epithelial cells and strongly in some tumour samples. These interactions are independent of the presence of ER α in the nucleus but correlate with the level of methylated ER α . The analysis of 175 tumours showed that ER α /Src, ER α /PI3K and mER α expression is correlated with Akt activation suggesting strongly that this pathway is operative *in vivo*. Interestingly, we found that the high expression of ER α /Src and ER α /PI3K is an independent poor prognostic marker associated with reduced disease free survival

IMPACT:

This is the first evidence that oestrogen non-genomic signalling occurs in breast tissue and is deregulated in a subset of breast tumours. The analysis of ER α /Src and ER α /PI3K interactions could be a new relevant tool for pathologist at diagnosis. We hypothesize that, based on the level of ER α /Src and ER α /PI3K interactions, the clinician could orientate the treatment towards Src or PI3K inhibitor associated with classical treatment for breast tumours.

All statistical analysis were performed using SAS[®] software, v 9.3 (SAS institute Inc, Cary, NC, USA) except the correlation study, carried out with R software.

Author contributions

CP performed most of the experiments of the paper; KBB performed biochemical experiments; SGL performed IHC experiments; EM and SC performed statistical analysis; IT, OT, EL, SC, LC and MLR analysed the data and wrote the manuscript; MLR supervised the work.

Acknowledgements

We thank Dr E. Delay for providing the reduction mammary samples, G. Castoria for the ER α peptides and C. Caux for the human breast CLB-SAV cells. We also thank F. Nasri and A. Colombe for technical support. This study was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009) and the 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. C. Poulard has a fellowship of French Ministry of Research and K. Bouchekioua-Bouzaghrou has a fellowship from LNCC.

Supporting Information is available at EMBO Molecular Medicine online.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Acevedo ML, Kraus WL (2003) Mediator and p300/CBP-steroid receptor coactivator complexes have distinct roles, but function synergistically, during estrogen receptor alpha-dependent transcription with chromatin templates. *Mol Cell Biol* 1: 335-348
- Araujo J, Logothetis C (2010) Dasatinib: a potent SRC inhibitor in clinical development for the treatment of solid tumors. *Cancer Treat Rev* 36: 492-500
- Barletta F, Wong CW, McNally C, Komm BS, Katzenellenbogen B, Cheskis BJ (2004) Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol Endocrinol* 18: 1096-1108
- Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, Sahmoud T (2002) Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 359: 2131-2139
- Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, et al (2004) p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci* 117: 1603-1611
- Campane M, Bondarenko I, Brincat S, Hotko Y, Munster PN, Chmielowska E, Fumoleau P, Ward R, Bardy-Bouxin N, Leip E, et al (2012) Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. *Ann Oncol* 23: 610-617
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20: 6050-6059
- Chen Y, Alvarez EA, Azzam D, Wander SA, Guggisberg N, Jordà M, Ju Z, Hennessy BT, Slingerland JM (2011) Combined Src and ER blockade impairs human breast cancer proliferation in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 1: 69-78

- Fernando RI, Wimalasena J (2004) Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Biol Cell* 15: 3266-3284
- Finn RS, Bengala C, Ibrahim N, Roche H, Sparano J, Strauss LC, Fairchild J, Sy O, Goldstein LJ (2011) Dasatinib as a single agent in triple-negative breast cancer: results of an open-label phase 2 study. *Clin Cancer Res* 17: 6905-6913
- Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS (2010) Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363: 1938-1948
- Ghayad SE, Cohen PA (2010) Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 5: 29-57
- Hammes SR, Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28: 726-741
- Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N *et al* (2001) Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 3459-3467
- Jensen EV, Jordan VC (2003) The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9: 1980-1989
- Johnston SR, Dowsett M (2003) Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3: 821-831
- Kumar R, Wang RA, Mazumdar A, Talukder AH, Mandal M, Yang Z, Bagheri-Yarmand R, Sahin A, Hortobagyi G, Adam L, *et al* (2002) A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* 418: 654-657
- Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 5: 597-622
- Le Romancer M, Treilleux I, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L (2010) Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75: 560-564
- Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31: 212-221
- Levin ER (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20: 477-482
- MacGregor JI, Jordan VC (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50: 151-196
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, *et al* (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-839
- Mayer EL, Krop IE (2010) Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin Cancer Res* 16: 3526-3532
- McKenna NJ, O'Malley BW (2002) Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* 108: 465-474
- Musgrove EA, Sutherland RL (2009) Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 631-643
- Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265: 69-72
- Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER (2004) Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 18: 2854-2865
- Sanchez AM, Flamini MI, Baldacci C, Goglia L, Genazzani AR, Simoncini T (2010) Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP. *Mol Endocrinol* 24: 2114-2125
- Shupnik MA (2004) Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 23: 7979-7989
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407: 538-541
- Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, *et al* (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3: 995-1000
- Song RX, Zhang Z, Santen RJ (2005) Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16: 347-353
- Tsai MJ, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63: 451-486
- Varricchio L, Migliaccio A, Castoria G, Yamaguchi H, de FA, Di DM, Giovannelli P, Farrar W, Appella E, Auricchio F (2007) Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol Cancer Res* 5: 1213-1221
- Warner M, Gustafsson JA (2006) Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids* 71: 91-95
- Weigel MT, Dowsett M (2010) Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer* 17: R245-R262
- Welsh AW, Lannin DR, Young GS, Sherman ME, Figueroa JD, Henry NL, Ryden L, Kim C, Love RR, Schiff R, *et al* (2012) Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 18: 118-126
- Yamashita H (2008) Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. *Int J Clin Oncol* 5: 380-383

Supplemental Data

Activation of rapid estrogen signaling in aggressive human breast cancers

Coralie Poulard, Isabelle Treilleux, Emilie Lavergne, Katia Bouchekioua-Bouzaghrou, Sophie Goddard-Léon, Sylvie Chabaud, Olivier Trédan, Laura Corbo and Muriel Le Romancer

Table of contents

Figure S1: In Situ PLA detection of ER α /PI3K and ER α /Src interactions upon tamoxifen treatment

Figure S2: Detection of endogenous interactions between ER α /SRC3 and ER α /p300.

Figure S3: In Situ PLA detection of FAK/Src and FAK/ ER α interactions in MCF-7 cells

Figure S4: In situ PLA detection of endogenous ER α /PI3K and ER α /Src interactions in human breast cancer cell lines

Figure S5: Kaplan-Meier estimates of OS by ER α /Src expression groups.

Figure S6: Kaplan-Meier estimates of OS by ER α /PI3K expression groups

Figure S7: Kaplan-Meier estimates of patient's outcome for mER α /ER α expression groups.

Figure S8: Kaplan-Meier estimates of DFS by ER α /Src intensity groups

Table S1: Distribution of ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /mER α data

Table S2: Distribution of clinical parameters according to groups of ER α /mER α expression

Table S3: Sample description: Distribution of clinical parameters.

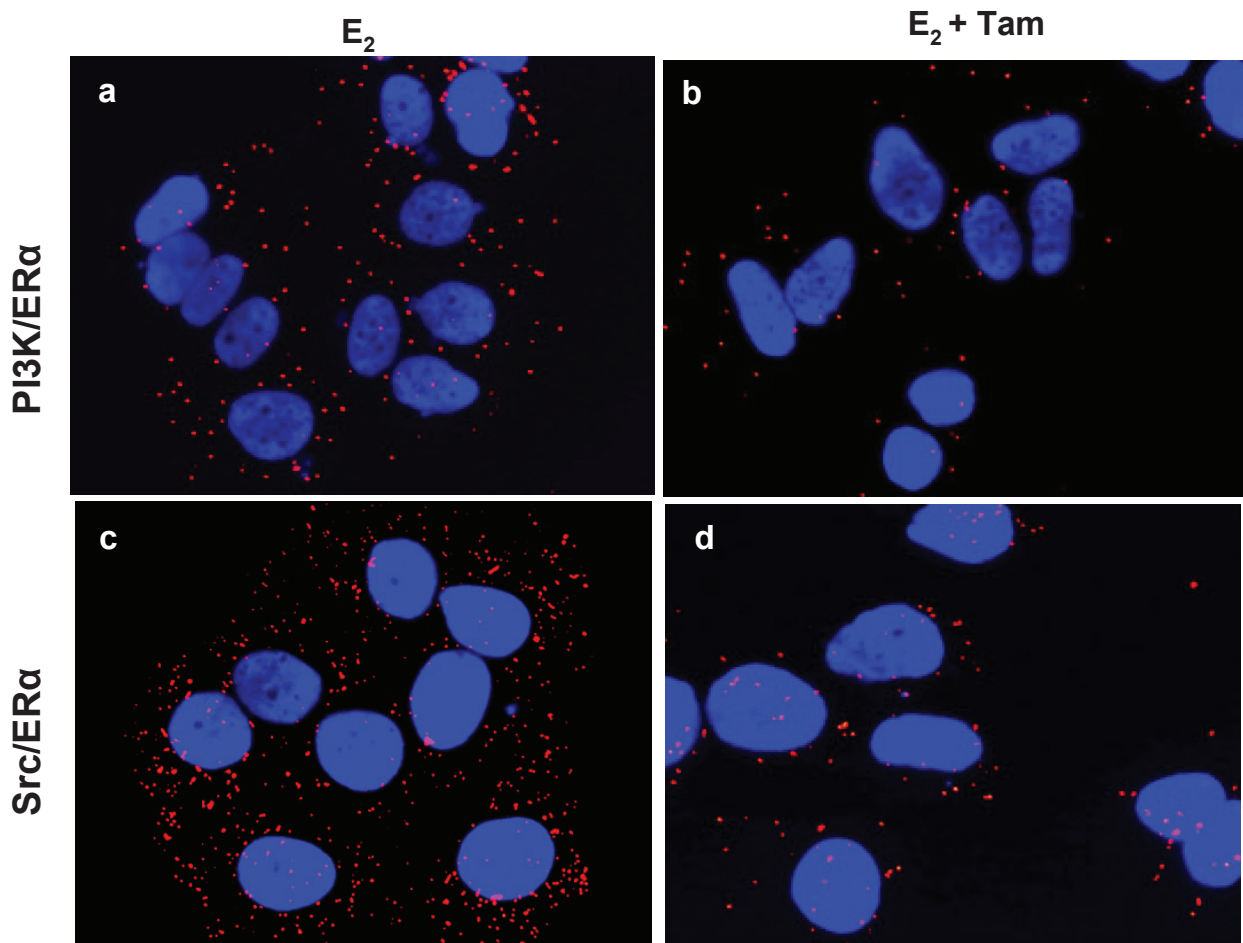
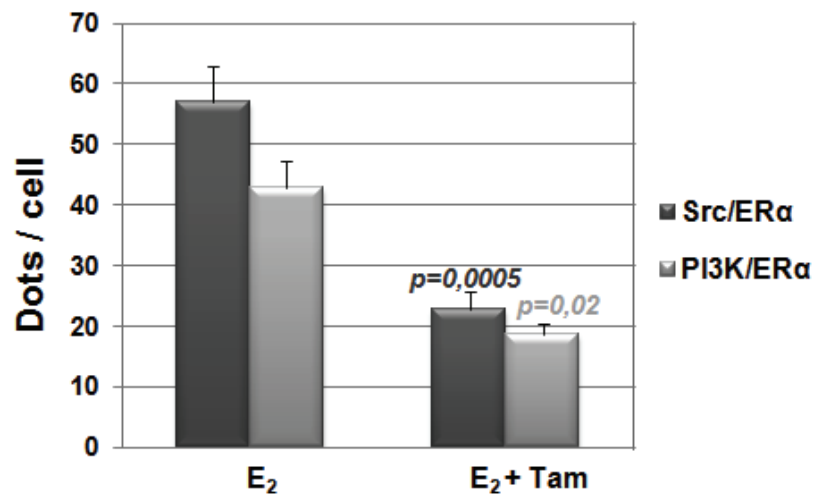
A**B**

Figure S1: In Situ PLA detection of ERα/PI3K and ERα/Src interactions upon tamoxifen treatment. A. Estrogen-deprived MCF-7 cells were incubated with E₂ (10⁻⁸M) or both E₂ plus tamoxifen (5X10⁻⁶M) for 5 min. After fixation, *in situ* PLA for ERα/PI3K (panel a,b) and ERα/Src dimers (panel c,d) was performed with ERα-, Src-, and PI3K-specific antibodies. The nuclei were counterstained with DAPI (blue). B. Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Materials and methods. The mean +/- s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's t-test.

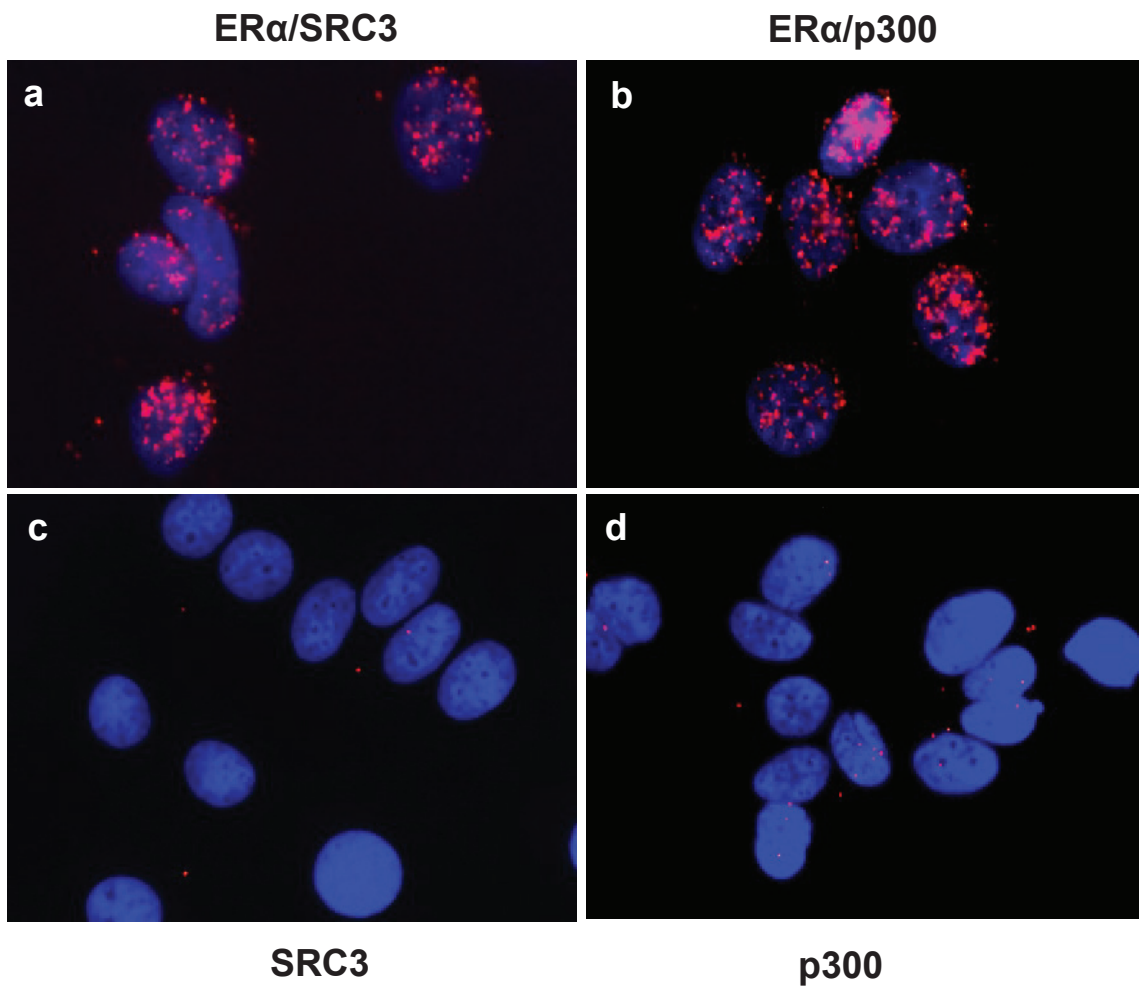
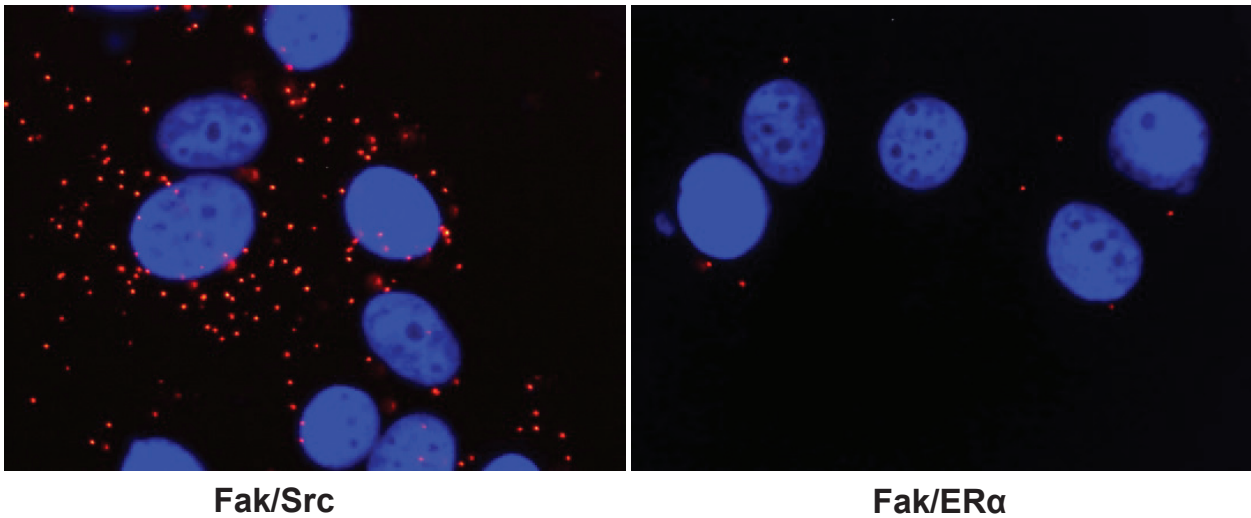


Figure S2: Detection of endogenous interactions between ERα/SRC3 and ERα/p300. PLA was performed on MCF-7 cells with two couples of antibodies: ERα/SRC3 (panel a) and ERα/p300 (panel b). Control experiments were performed using only one primary antibody: anti-SRC3 (panel c) or anti-p300 (panel d). The nuclei were counterstained with DAPI (blue).

A



B

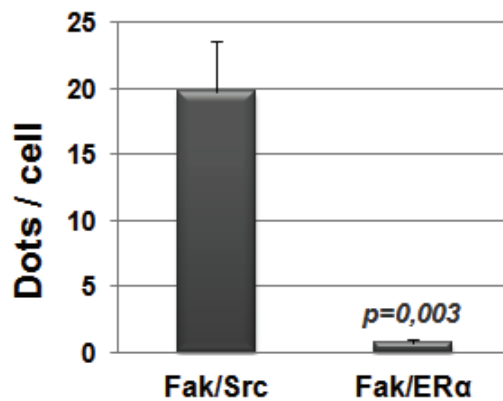


Figure S3: In Situ PLA detection of FAK/Src and FAK/ ER α interactions in MCF-7 cells

A. Estrogen-deprived MCF-7 cells were incubated with E₂ 10⁻⁸M for 5 min. After fixation, *in situ* PLA for FAK/Src (panel a) and FAK/ER α dimers (panel b) was performed with indicated antibodies. **B.** Quantification of the number of signals was performed as described previously. . The mean +/- s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's t-test.

A

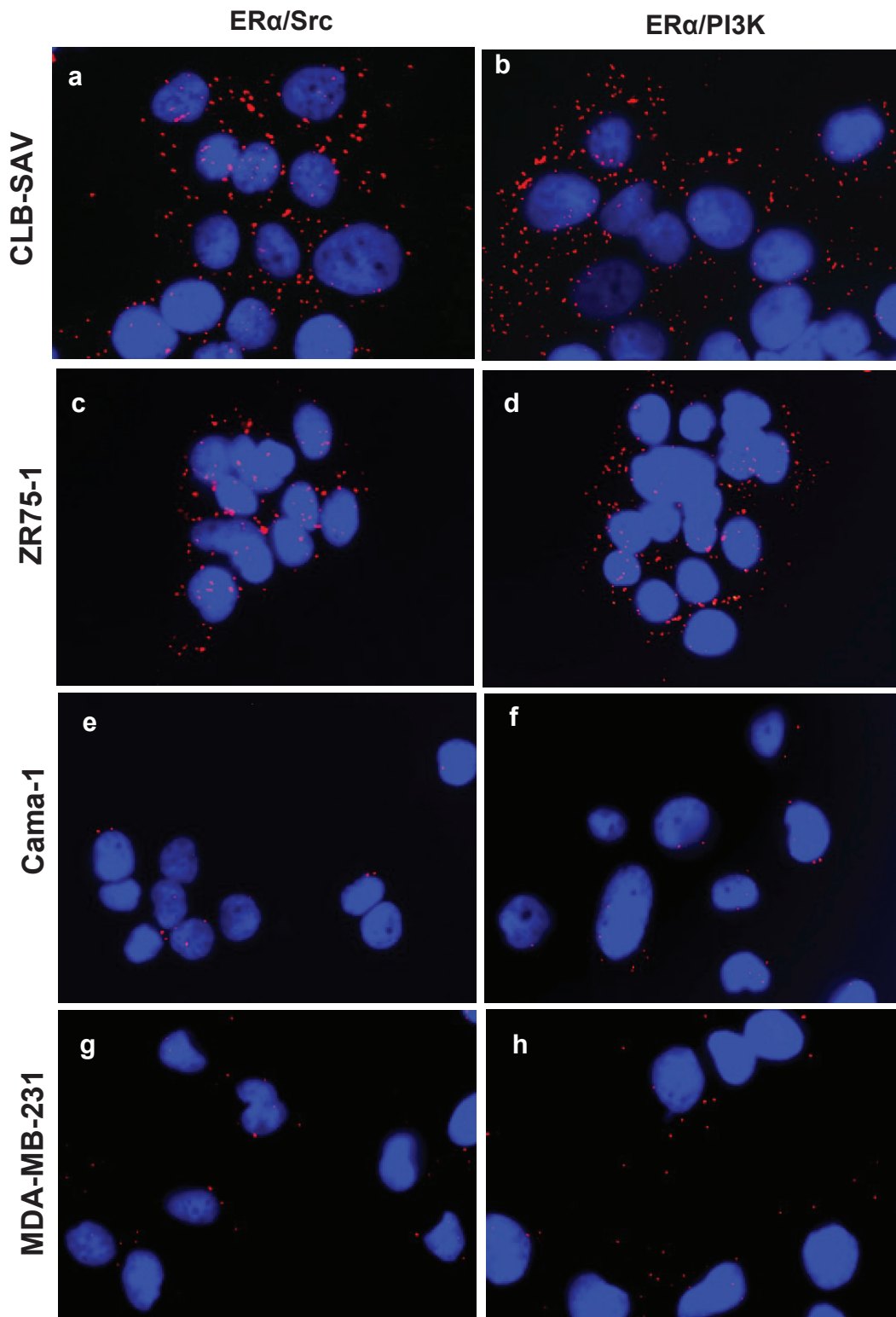


Figure S4

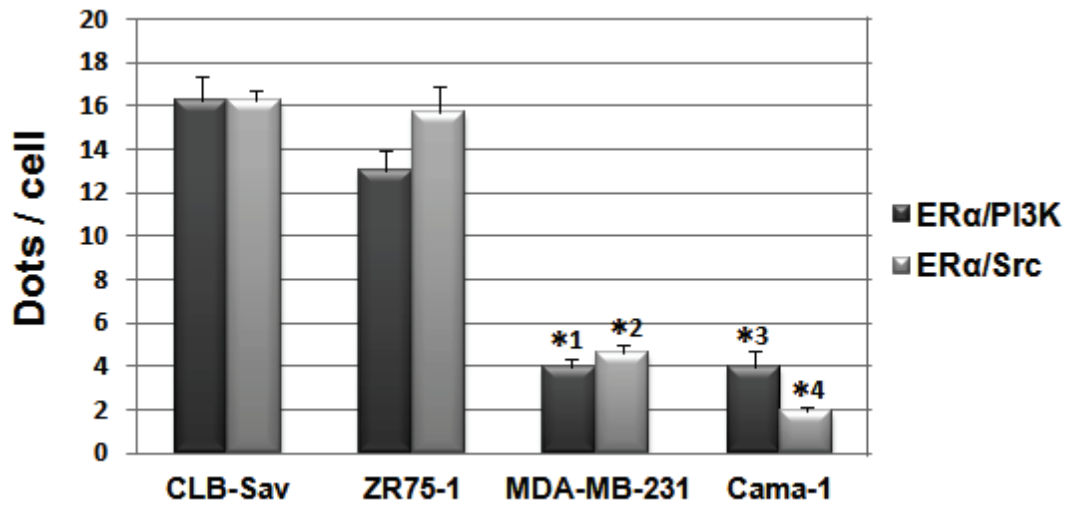
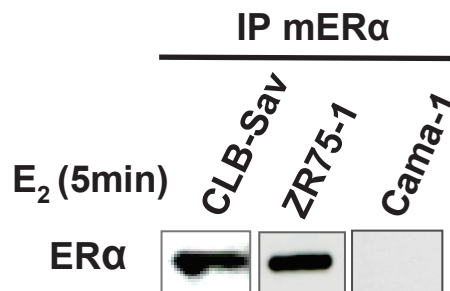
B**C****D**

Figure S4: In situ PLA detection of endogenous ERα/PI3K and ERα/Src interactions in human breast cancer cell lines. **A.** *In situ* PLA of ERα/PI3K and ERα/Src interactions were performed in several human breast tumor cell lines. CLB-SAV (panels a,b); ZR75-1 (panels c,d); Cama-1 (panels e,f); MDA-MB-231 (panels g,h). **B.** Quantification of the number of signals was performed as described previously. The mean \pm s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's t-test. For PI3K/ERα : *1 $p=0,0006$ (CLB-Sav vs MDA-MB-231), $p=0,0001$ (ZR-75.1 vs MDA-MB-231), *3 $p=1,6 \cdot 10^{-5}$ (CLB-Sav vs Cama-1), $p=0,0005$ (ZR-75.1 vs Cama-1). For Src/ERα : *2 $p=0,004$ (CLB-Sav vs MDA-MB-231), $p=0,0002$ (ZR-75.1 vs MDA-MB-231), *4 $p=0,004$ (CLB-Sav vs Cama-1), $p=0,0002$ (ZR-75.1 vs Cama-1) **C.** Lysates of CLB-SAV, MDA-MB-231, ZR75-1 and Cama-1 cells were analyzed by western blot for ERα expression. **D.** Cells lysates were immunoprecipitated with anti-mERα and blotted with anti-ERα.

All patients
(n=175)

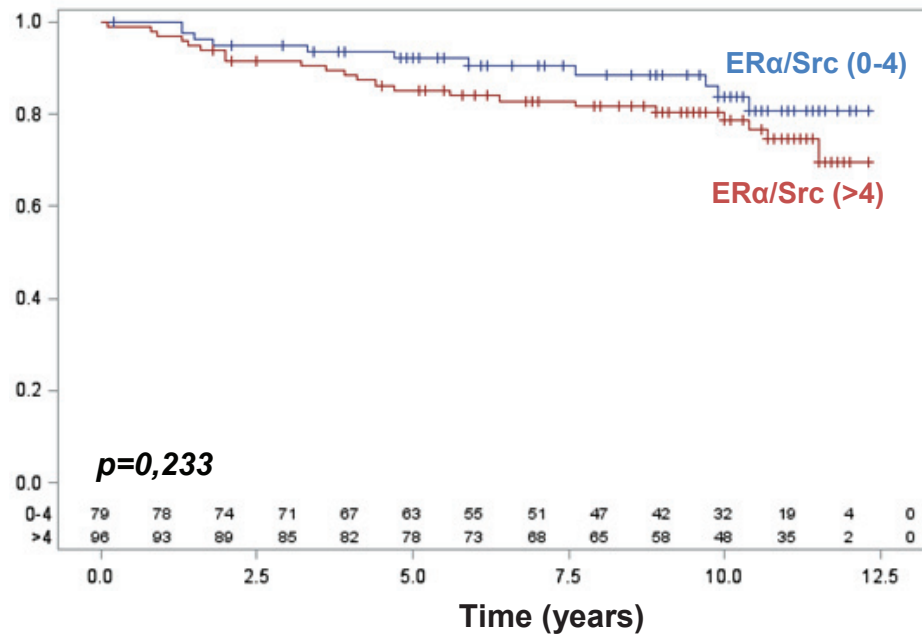


Figure S5: Kaplan-Meier estimates of OS by ERα/Src expression groups. Global population (with a cut off at 4 spots per cell).

All patients
(n=175)

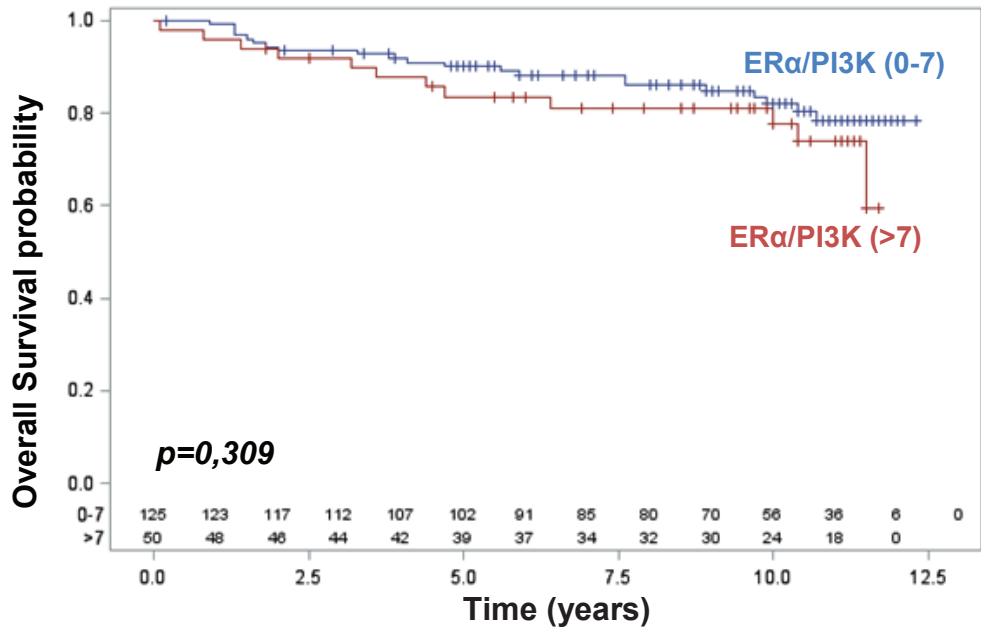
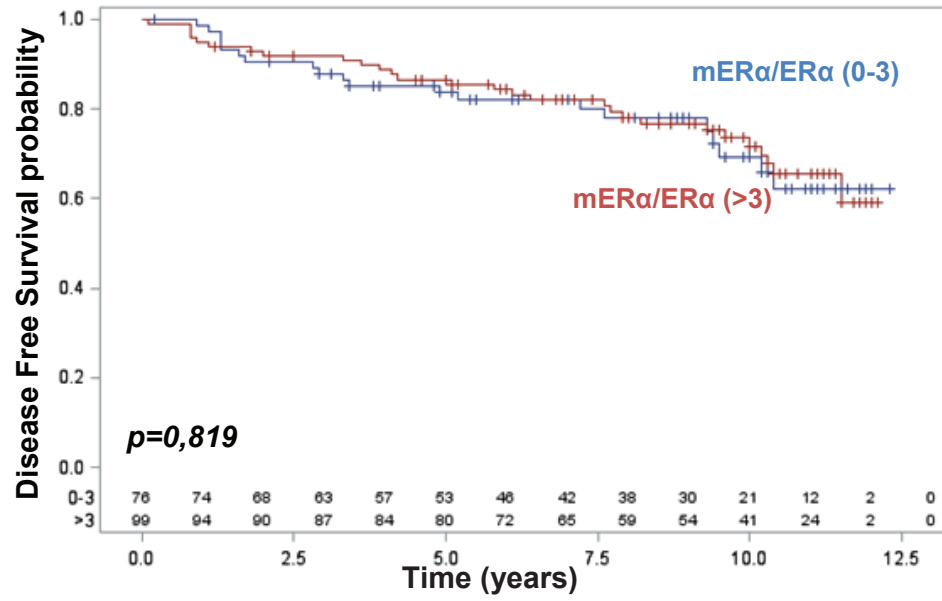


Figure S6: Kaplan-Meier estimates of OS by ERα/PI3K expression groups. Global population (with a cut off at 7 spots per cell).

A

All patients
(n=175)



B

All patients
(n=175)

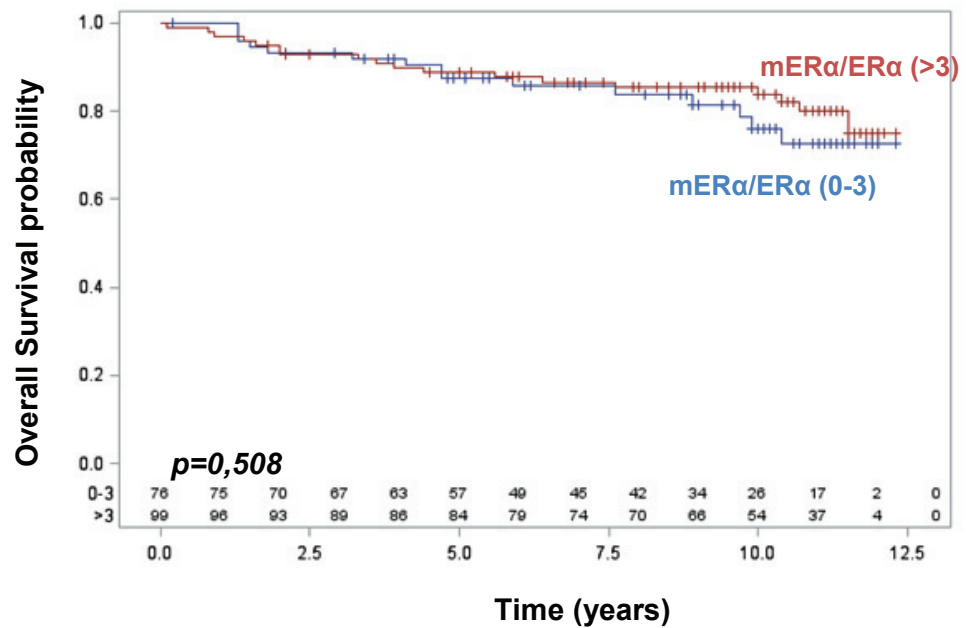


Figure S7: Kaplan-Meier estimates of patient's outcome for mERα/ERα expression groups. Global population (with a cut off at 3 spots per cell) for DFS (A) and for OS (B).

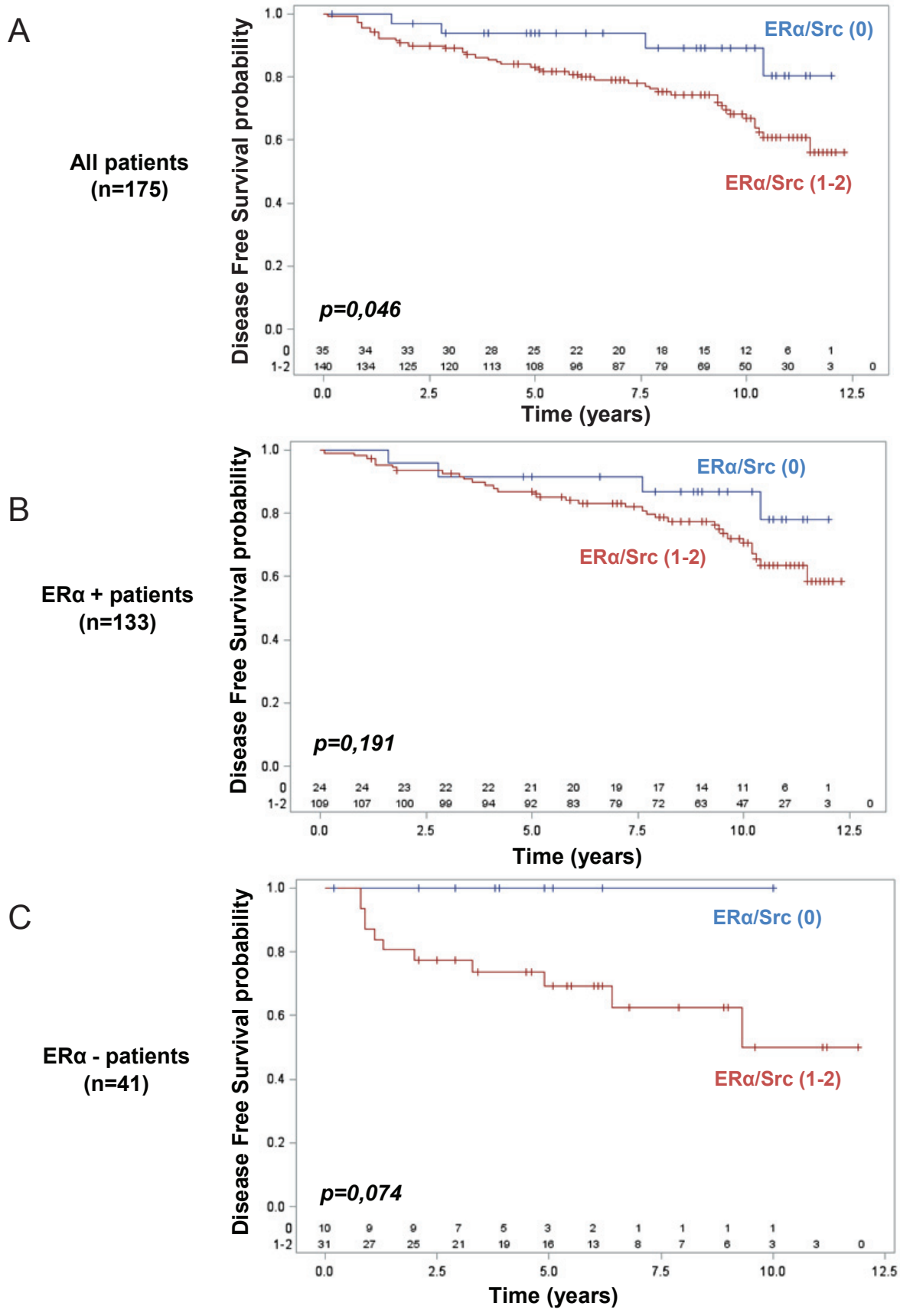


Figure S8: Kaplan-Meier estimates of DFS by ERα/Src intensity groups. A) Global population (with a cut off at 0 versus 1, 2). B) ERα -positive cases. C) ERα -negative cases.

| Duolink counting (dots/cell) | Src/ER α | | PI3K/ER α | | mER α /ER α | |
|---------------------------------|-----------------|------|------------------|------|---------------------------|------|
| | N | % | N | % | N | % |
| 0 | 4 | 2.3 | 10 | 5.7 | 14 | 8.0 |
| 1 | 27 | 15.4 | 17 | 9.7 | 26 | 14.9 |
| 2 | 9 | 5.1 | 4 | 2.3 | 16 | 9.1 |
| 3 | 16 | 9.1 | 16 | 9.1 | 20 | 11.4 |
| 4 | 23 | 13.1 | 18 | 10.3 | 25 | 14.3 |
| 5 | 22 | 12.6 | 26 | 14.9 | 26 | 14.9 |
| 6 | 17 | 9.7 | 18 | 10.3 | 11 | 6.3 |
| 7 | 15 | 8.6 | 16 | 9.1 | 15 | 8.6 |
| 8 | 18 | 10.3 | 12 | 6.9 | 10 | 5.7 |
| 9 | 9 | 5.1 | 12 | 6.9 | 3 | 1.7 |
| 10 | 5 | 2.9 | 6 | 3.4 | 3 | 1.7 |
| 11 | 5 | 2.9 | 8 | 4.6 | 2 | 1.1 |
| 12 | 1 | 0.6 | 2 | 1.1 | 1 | 0.6 |
| 13 | 2 | 1.1 | 3 | 1.7 | 0 | |
| 14 | 0 | | 2 | 1.1 | 1 | 0.6 |
| 15 | 0 | | 1 | 0.6 | 0 | |
| 16 | 0 | | 1 | 0.6 | 1 | 0.6 |
| 17 | 0 | | 1 | 0.6 | 0 | |
| 18 | 0 | | 1 | 0.6 | 1 | 0.6 |
| 19 | 1 | 0.6 | 0 | | 0 | |
| 21 | 1 | 0.6 | 0 | | 0 | |
| 26 | 0 | | 1 | 0.6 | 0 | |

Table S1: Distribution of ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /mER α data. This table shows the distribution of the number of dots/cell cfor each couple in the 175 breast tumors.

| Clinical parameters | Duolink ER α /mER α | | | | Test |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------|------------|------|--------------------|
| | 0-3 N=76 | | >3 N=99 | | |
| | N | % | N | % | |
| Age at diagnosis (years) | | | | | Chi-2 P = 0.039 |
| < 50 ans | 18 | 23.7 | 38 | 38.4 | |
| >=50 ans | 58 | 76.3 | 61 | 61.6 | |
| Menopause | | | | | Chi-2 P = 0.044 |
| ND | 2 | | 1 | | |
| No | 20 | 27.0 | 41 | 41.8 | |
| Yes | 54 | 73.0 | 57 | 58.2 | |
| Tumour size (mm) | | | | | Chi-2 P = 0.901 |
| < 20 mm | 30 | 39.5 | 40 | 40.4 | |
| >= 20 mm | 46 | 60.5 | 59 | 59.6 | |
| Histological grade (SBR) | | | | | Chi-2 P = 0.030 |
| 1 | 18 | 23.7 | 14 | 14.1 | |
| 2 | 23 | 30.3 | 49 | 49.5 | |
| 3 | 35 | 46.1 | 36 | 36.4 | |
| Lymph node involvement | | | | | Chi-2 P = 0.347 |
| N0 | 29 | 38.2 | 47 | 47.5 | |
| Micro metastasis | 9 | 11.8 | 7 | 7.1 | |
| Macro metastasis | 38 | 50.0 | 45 | 45.5 | |
| Lympho-vascular invasion | | | | | Chi-2 P = 0.937 |
| Yes | 35 | 46.1 | 45 | 45.5 | |
| No | 41 | 53.9 | 54 | 54.5 | |
| Estrogen receptor : % marked cells | | | | | Chi-2 P = 0.022 |
| ND | 1 | | 0 | | |
| < 10% | 24 | 32.0 | 17 | 17.2 | |
| >= 10% | 51 | 68.0 | 82 | 82.8 | |
| Progesterone receptor : % marked cells | | | | | Chi-2 P = 0.584 |
| ND | 1 | | 0 | | |
| < 10% | 28 | 37.3 | 33 | 33.3 | |
| >= 10% | 47 | 62.7 | 66 | 66.7 | |
| HER2 status | | | | | Chi-2 P = 0.174 |
| ND | 7 | | 3 | | |
| 0/+/>++FISH- | 62 | 89.9 | 79 | 82.3 | |
| ++FISH+/>+++ | 7 | 10.1 | 17 | 17.7 | |

Table S2: Distribution of clinical parameters according to groups of ER α /mER α expression. Clinical parameters (age at diagnosis, tumor size, menopausal status, lymph node involvement, SBR grading and hormonal expression) were analyzed for the 175 patients included in the TMA study. Association between clinical characteristics and the level of ER α /mER α interaction was determined using χ^2 test or Fisher's exact test.

| Clinical Parameters | All N=175 | |
|-----------------------------------------------|--------------|---------|
| Age at diagnosis (years) | | |
| < 50 | 56 | (32.0%) |
| >=50 | 119 | (68.0%) |
| Menopause | | |
| ND | 3 | |
| No | 61 | (35.5%) |
| Yes | 111 | (64.5%) |
| Tumor size (mm) | | |
| < 20 mm | 70 | (40.0%) |
| >= 20 mm | 105 | (60.0%) |
| Histological grade (SBR) | | |
| 1 | 32 | (18.3%) |
| 2 | 72 | (41.1%) |
| 3 | 71 | (40.6%) |
| Lymph node involvement | | |
| N0 | 76 | (43.4%) |
| Micro metastasis | 16 | (9.1%) |
| Macro metastasis | 83 | (47.4%) |
| Lympho-vascular invasion | | |
| Yes | 80 | (45.7%) |
| No | 95 | (54.3%) |
| Estrogen receptor : % marked cells | | |
| ND | 1 | |
| < 10% | 41 | (23.6%) |
| >= 10% | 133 | (76.4%) |
| Progesterone receptor : % marked cells | | |
| ND | 1 | |
| < 10% | 61 | (35.1%) |
| >= 10% | 113 | (64.9%) |
| HER2 status | | |
| ND | 10 | |
| 0/+/>++FISH- | 141 | (85.5%) |
| ++FISH+/+++ | 24 | (14.5%) |

Table S3: Sample description: Distribution of clinical parameters.

Clinical parameters (age at diagnosis, tumor size, menopausal status, lymph node involvement, SBR grading and hormonal expression) were analyzed for the 175 patients included in the TMA study with a cut off at 3 dots/cell.

c- Discussion

Dans un premier temps, nous avons validé la spécificité de l'approche du Duolink dans des lignées cellulaires mammaires, à l'aide de combinaisons de siRNA, ou d'inhibiteurs protéiques. Cela nous a permis de valider les données obtenues par immunoprécipitation quant à la formation et à la régulation du complexe (Le Romancer et al., 2008). Il est entendu que la technologie du Duolink comporte certaines limitations, que ce soit au niveau expérimental ou conceptuel. En effet, pour que l'on obtienne un signal positif en Duolink (visualisé par la présence d'un point rouge dans la cellule), la distance nécessaire entre deux sondes PLA doit être de maximum 40nm pour qu'il y ait hybridation, ligation et amplification. On peut imaginer que la positivité du signal que l'on détecte en Duolink est simplement due à une « proximité » entre deux protéines et non pas une interaction. Cependant, cette technologie confirme en partie la présence des deux protéines dans un même complexe.

L'existence des voies non génomiques reste la question fondamentale de ce travail. De ce fait, nous avons analysé le complexe mER α /Src/PI3K dans le tissu mammaire par cette même technique sur quelques tumeurs. L'analyse d'un nouveau couple a été intégrée dans ce travail, mER α /ER α . La détection de cette interaction dans les cellules ne pouvait être réalisée. En effet, l'anticorps mER α ne fonctionne pas ni en immunofluorescence ni en Duolink après fixation des lignées cellulaires mammaires. Nous avons ainsi montré que ER α s'associe avec PI3K et Src dans le cytoplasme des cellules épithéliales mammaires. Le signal est faible dans le tissu normal et dérégulé dans certaines tumeurs mammaires humaines.

A la suite de cela, nous avons décidé d'étudier la formation de ce complexe sur une plus grande cohorte de patientes. Nous avons réalisé ce travail sur des TMAs grâce à une variante de la technologie du Duolink qui utilise une révélation « brighfield ». A la place d'utiliser des oligonucléotides fluorescents, nous utilisons des sondes couplées à la peroxydase. Les points sont alors marrons. Un des avantages de cette révélation est que les tissus sont facilement visualisables après coloration et on n'observe pas de décroissance du signal avec le temps. Nous avons obtenu ainsi le même type de résultats que dans la première analyse, des tumeurs positives pour l'expression du complexe mER α /Src/PI3K et d'autres négatives. Après validation par Isabelle Treilleux (Medecin anatomopathologiste) des zones tumorales, sur chaque couple (ER α /Src, ER α /PI3K, ER α /mER α), j'ai réalisé un comptage du nombre de points par cellules tumorales. Sur chaque tumeur, en moyenne, 400 cellules tumorales ont été comptées, et une moyenne du nombre de points par cellules tumorales a été estimée. A la suite de cela, nous avons réalisé une analyse statistique entre ces différents comptages (c'est-à-dire entre les différents couples). Sur cette cohorte de patientes, nous avons trouvé une corrélation significative entre les interactions ER α /PI3K, ER α /Src et l'expression de mER α . De plus, une analyse de l'activation d'AKT a été réalisée. Pour cela, nous avons étudié la phosphorylation d'AKT par immunohistochimie sur les mêmes tumeurs. Des études de corrélations entre chaque couple et p-AKT montrent une forte corrélation entre l'expression de ce complexe et l'activation de son effecteur *en aval* AKT.

Ces données ont été complétées ultérieurement par l'étude de la phosphorylation d'effecteurs *en aval* d'AKT ; p-4EBP1 et p-S6K1 (**Figure 28**). De manière très intéressante, des études de corrélations entre ces effecteurs et l'expression du complexe mER α /Src/PI3K ont permis de montrer qu'il existe une corrélation entre le complexe et l'activation de p-4EBP1 et p-S6K1 (**Tableau 6**). Il est bien décrit que AKT active la voie mTor suite à une stimulation des récepteurs aux facteurs de croissance. Toutefois, pour la première fois, nous avons démontré que les voies non génomiques ER α dépendantes activent la voie AKT/mTor dans les tumeurs. Cette voie de signalisation joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire et la résistance aux thérapies endocrininennes (Ghayad et al., 2010).

| | p-S6K1: en intensité | | Test |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Intensité = 0-1 N=61 | Intensité = 2-3 N=70 | |
| Src / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 58 4.78 (2.88) | 66 6.12 (4.15) | T-test p=0.041 |
| PI3K / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 58 5.98 (3.50) | 66 7.06 (4.51) | T-test p=0.144 |
| mER α / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 58 4.12 (2.57) | 66 5.32 (3.75) | T-test p=0.043 |

| | p-4EBP1 : en intensité | | Test |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Intensité = 0 N=77 | Intensité = 1-3 N=54 | |
| Src / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 73 4.77 (3.03) | 49 6.47 (3.94) | T-test p=0.008 |
| PI3K / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 73 5.97 (3.77) | 49 7.35 (4.43) | T-test p=0.068 |
| mER α / ER α Effectif Moyenne (écart type) | 73 4.48 (2.58) | 49 4.69 (3.80) | T-test p=0.711 |

Tableau 6 : Analyse de corrélation entre mER α /Src/PI3K et la signalisation AKT/mTor

Etude de corrélation entre les interactions Src/ER α , PI3K/ER α et mER α /ER α étudiés en Duolink et l'expression de p-4EBP1 et p-S6K1 en immunohistochimie.

Toutes ces données tendent à mettre fin aux controverses existant concernant les voies non génomiques des œstrogènes.

- (i) L'analyse des interactions ER α /Src, ER α /PI3K et la méthylation de ER α (mER α /ER α) par Duolink associées à l'étude de l'expression des protéines phosphorylées AKT, 4EBP1

et S6K1 suggèrent fortement que le complexe mER α /Src/PI3K existe *in vivo* et que la voie de signalisation *en aval* est active puisque l'expression de ce complexe est corrélée à l'activation d'AKT, de 4EBP1 et de S6K1.

- (ii) L'étude de Welsh et al. avait préalablement démontré sur 3200 tumeurs, que seule 1,5% d'entre elles présentaient un marquage cytoplasmique de ER α , suggérant que les voies non génomiques étaient négligeables (Welsh et al., 2012). La technologie du Duolink nous a permis de montrer que 55% des tumeurs mammaires présentent une hyperactivation de cette voie de signalisation. Cette différence peut s'expliquer par le fait que seule une fraction de ER α est localisée dans le cytoplasme, suffisante pour activer les voies de signalisation *en aval*. Cependant, cette fraction doit être relativement faible par rapport à la fraction nucléaire de ER α et est difficilement détectable par immunohistochimie. La technologie du Duolink, par un jeu d'amplification du signal, est beaucoup plus sensible et représente un outil puissant pour l'étude des voies non génomiques.
- (iii) Nos données valident le fait que les voies non génomiques de ER α sont médiées par une fraction de ER α conventionnel. En effet, nous utilisons un anticorps anti-ER α conventionnel associé à un anti-Src, PI3K ou mER α . De plus, ce complexe présente une localisation cytoplasmique. Ces données sont en accord avec les données de Kumar et al. qui avait démontré que ER α peut être séquestré dans le cytoplasme *via* un variant de MTA1, MTA1s (metastasis-associated antigen 1 short form), sans démontrer que la voie de signalisation *en aval* était activée (Kumar et al., 2002).
- (iv) Certains auteurs parlent d'une convergence entre les voies génomiques et non génomiques (Björnström et al., 2005; Ordóñez-Morán et al., 2009). Nos résultats supportent le concept de deux signalisations indépendantes. 54% des tumeurs ER α négatives, c'est-à-dire qu'elles n'expriment pas ER α dans le noyau, présentent une surexpression du complexe mER α /Src/PI3K. Dans ces tumeurs, on peut exclure l'existence d'une signalisation génomique de ER α . Ces données confirment l'analyse précédente de l'équipe concernant l'expression de ER α méthylé en immunohistochimie, sur une cohorte indépendante de 164 tumeurs. 53% des tumeurs ER α négatives présentaient une hyperméthylation de ER α (Le Romancer et al., 2008).
- (v) La fonctionnalité même des voies non génomiques est parfois remise en question. Dans cette étude nous avons démontré que l'association entre ER α /Src et ER α /PI3K est corrélée à d'autres facteurs pronostics tels qu'un haut grade SBR, ou encore l'envahissement ganglionnaire. Nous avons préalablement démontré que le complexe mER α /Src/PI3K recrute FAK après stimulation œstrogénique. Il est bien connu que FAK est impliqué dans la formation de métastases (Steeg et al., 2006). Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'interaction entre ER α et FAK,

probablement du fait que FAK fait parti du complexe par l'intermédiaire de Src. La distance d'interaction est probablement trop importante pour permettre l'hybridation entre les sondes PLA. Cependant, l'association entre ER α /Src et l'envahissement ganglionnaire suggère l'implication de l'activité de FAK dans la signalisation non génomique œstrogéno-dépendante.

Après analyse de l'association entre l'expression de mER α /Src/PI3K et la survie des patientes, nous avons pu montrer qu'une forte expression de ER α /Src et ER α /PI3K est associée à une diminution de la survie sans progression. Une analyse statistique multivariée a permis de montrer qu'une forte expression de ER α /Src ou ER α /PI3K est un facteur indépendant de mauvais pronostic. La dérégulation des voies non génomiques pourraient donc ouvrir de nouvelles perspectives quant aux thérapies anti-cancéreuses. Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet "Detection of the ERalpha/Src/PI3K complexe as predictive marker in Breast Cancer" en 2012.

Seule l'expression de ER α dans le noyau est prise en compte au diagnostic. Cela constitue d'ailleurs le principal biomarqueur de réponse à l'hormonothérapie puisque seule les patientes présentant une tumeur ER α positives sont traitées par hormonothérapie. Il est clairement établi qu'il existe une activation aberrante des voies AKT/mTor dans le cancer du sein. Cette signalisation déclenche une cascade d'évènements biologiques contribuant à la progression tumorale. Comme nous l'avons exposé précédemment, certains inhibiteurs de cette voie de signalisation sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques. Sachant que nous observons une surexpression de la voie de signalisation des voies non génomiques dans 54% des tumeurs mammaires, corrélées à l'activation de la voie AKT/mTor, il serait intéressant d'étudier l'effet de ces drogues sur les tumeurs dans lesquelles cette voie est activée. De même, les inhibiteurs de Src peuvent être des candidats intéressants. En effet, dans les cellules, nous avons démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de Src inhibe la méthylation de ER α et induit la dissociation du complexe. Certaines études cliniques sont en cours afin d'étudier l'effet d'un inhibiteur de Src en combinaison avec d'autres thérapies (Mayer et al., 2010). Cependant, il est très important pour toutes thérapies de disposer d'un biomarqueur prédictif de la réponse aux traitements. L'analyse de l'expression du complexe mER α /Src/PI3K au diagnostic pourrait permettre de stratifier les patientes présentant une hyperactivation de cette voie de signalisation et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

II- LKB1, partenaire du complexe mER α /Src/PI3K

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Katia Bouchekiou-Bouzaghrou, une étudiante en thèse qui a soutenu en juillet 2012. C'est la raison pour laquelle je ne présente qu'une brève introduction concernant la protéine LKB1.

a- Introduction

i. Le syndrome de Peutz-Jeghers.

La sérine/thréonine kinase LKB1 est encodée par le gène *STK11/LKB1*. Des mutations germinales de ce gène sont à l'origine du syndrome de Peutz-Jeghers (PJS). Ce syndrome est caractérisé par l'association de polypes intestinaux et gastriques avec une pigmentation anormale de la peau et des muqueuses. Le PJS est une maladie héréditaire rare et son incidence est d'environ 1/200000 (Burt et al., 2005). Il est établi que la transmission de la maladie est autosomale dominante avec une forte pénétrance. Le gène *STK11/LKB1*, localisé sur le chromosome 19p13.3 est responsable de la maladie dans 70% des familles. A ce jour environ 150 mutations germinales différentes ont été caractérisées chez 193 familles portant le PJS. Ce gène peut être inactivé et impliqué dans le PJS selon différentes modifications génétiques aboutissant à la traduction d'une forme tronquée de LKB1 ou bien à un épissage aberrant. Parmi les mutations décrites, on observe des délétions ou des insertions qui créent des décalages du cadre de lecture et des codons stop. Dans certains cas, la délétion du gène entier a été observée. La plupart des mutations observées sont localisées dans le domaine kinase de LKB1 (pour revue (Alessi et al., 2006)).

Les patients affectés par ce syndrome ont un risque relatif de développer un cancer pouvant être jusqu'à 18 fois plus élevé que la population générale. Le spectre des cancers observés s'étend des cancers gastro-intestinaux (colorectal et pancréatique), aux cancers extra-intestinaux, tel que le poumon ou les organes sexuels (sein, cellules de la granulosa de l'ovaire, utérus, cellules de Sertoli des testicules). En effet, le risque de développer un cancer du sein chez les femmes atteintes de PJS est de 54% et est comparable à celui observé chez les femmes porteuses des mutations BRCA1 et BRCA2 (pour revue (Jansen et al., 2009)). De ce fait, un dépistage régulier est proposé aux personnes atteintes du syndrome de PJS.

ii. La protéine LKB1.

La génération de modèles murins de LKB1 knock-out (KO) a permis de montrer l'importance de la protéine LKB1. Les souris KO pour LKB1 meurent à 10,5 jours de développement (Ylikorkala et al., 2001). De plus, la surexpression de LKB1 dans des cellules n'exprimant pas LKB1 (Hela ou G361) cause un arrêt du cycle cellulaire. Des mutants de LKB1, catalytiquement inactif, dont certains sont isolés des patients de PJS, ne peuvent pas inhiber la croissance cellulaire (Tiainen et al., 1999). Il semble donc que c'est l'activité catalytique intrinsèque de la protéine sérine-thréonine kinase qui est requise pour bloquer le cycle cellulaire. Ces différentes observations,

confirmées par des modèles de KO conditionnelles de *lkb1* dans le sein par exemple (McCarthy et al., 2009), ont conduit à classer LKB1 comme un suppresseur de tumeurs.

La protéine LKB1 est retrouvée impliquée dans le contrôle du métabolisme et de la polarité cellulaire et différentes autres fonctions telles que la prolifération, la migration, la sénescence, l'apoptose, la réponse aux dommages de l'ADN et la différenciation (pour revue (Vaahtomeri et al., 2011)). LKB1 exerce ses effets cellulaires principalement *via* la phosphorylation de ses principaux substrats, les protéines de la famille des protéines kinases AMPK (AMP dependant protein kinase). Lorsque les kinases de cette famille sont catalytiquement actives, elles relaient les différents processus physiologiques impliquant LKB1 sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

Dans les cellules, LKB1 est associée à la protéine adaptatrice MO25 (mouse protein 25) et à la pseudokinase STRAD (Ste-20 Related ADaptator) (Baas et al., 2003; Boudeau et al., 2003). Ces deux protéines potentialisent l'activation de LKB1 et induisent sa localisation cytoplasmique. STRAD est appelée pseudokinase du fait qu'il lui manque plusieurs résidus catalytiques clés, notamment les résidus Asp-Glu-Phe, essentiels pour la liaison du magnésium, qui coordonnent l'activité kinase. STRAD possède les motifs conservés lui permettant de lier l'ATP et l'ADP avec une grande affinité (Boudeau et al., 2004). L'activité kinase de LKB1 est sensiblement augmentée par une modification allostérique induite par STRAD. Quant à MO25, elle interagit directement avec LKB1 et STRAD afin de stabiliser l'interaction LKB1/STRAD (Boudeau et al., 2004).

iii. Régulation de LKB1.

La protéine LKB1, de 55kDa, possède un domaine catalytique et deux régions non catalytiques en N et C-terminal. Ces deux régions ne possèdent aucune fonction identifiable. Deux signaux de localisation nucléaire (NLS) ont été identifiés en N-terminal. LKB1 est sujette à diverses modifications post-traductionnelles qui régulent ses fonctions. LKB1 est autophosphorylée sur les résidus T185, T189, T336 et S402 (**Figure 46**). La thréonine 336 phosphorylée, site majeur d'autophosphorylation de LKB1, inhibe la fonction onco-suppressive de LKB1 (Sapkota et al., 2002). LKB1 est également phosphorylée sur les résidus S31, S307, S325, S334, T363 et S428 par d'autres kinases (**Figure 46**). Ces différentes phosphorylations régulent la croissance cellulaire (S428) (Sapkota et al., 2001), l'interaction entre LKB1 et AMPK (S325) (Zheng et al., 2009), la régulation des dommages à l'ADN (T363) (Alexander et al. 2010) ou encore la localisation de LKB1, que ce soit la phosphorylation de la sérine 334 (Liu et al., 2012b; Bai et al., 2012) ou celle de la sérine 307 (Xie et al., 2009). De plus, un site de prénylation a été identifié dans le domaine C-terminal (Collins et al., 2000) permettant la localisation membranaire de la protéine, ainsi qu'un site d'acétylation sur la lysine 48 qui régule l'affinité de LKB1 pour STRAD et donc l'activité du complexe (Lan et al., 2008) (**Figure 46**).

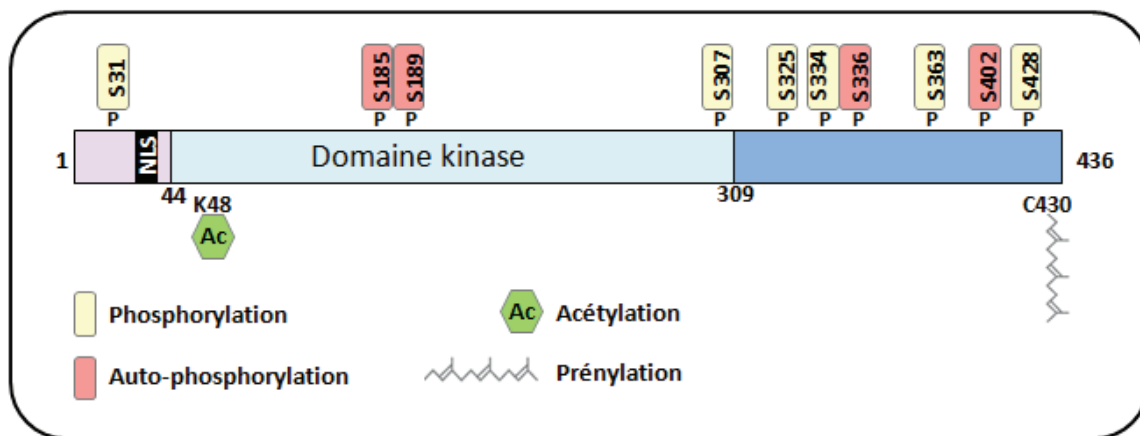


Figure 46 : Les modifications post-traductionnelles de LKB1

LKB1 dispose de signaux de localisation nucléaire (NLS), de différents sites de phosphorylation (P), d'un site d'acétylation. LKB1 est aussi prénylée.

Les cochaperones Hsp90 et Cdc37 sont deux protéines partenaires de LKB1. Gaude et al. ont montré que LKB1 ne possède pas d'activité enzymatique lorsqu'elle est associée au complexe chaperon Hsp90/Cdc37, alors que le complexe enzymatique LKB1/STRAD/MO25 possède une activité kinase (Gaude et al., 2012). LKB1 serait maintenue inactive dans le complexe LKB1/Hsp90/Cdc37. Les auteurs suggèrent que ce complexe est nécessaire à la maturation conformationnelle de LKB1 nécessaire à son interaction avec STRAD et MO25 (Gaude et al., 2012).

iv. Localisation cellulaire

LKB1 est une protéine majoritairement cytoplasmique. Cela est en adéquation avec les données indiquant que dans les cellules en migration, LKB1 est concentrée à la membrane ce qui dirige les événements migratoires. De plus, le complexe LKB1/STRAD colocalise avec l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes (Sebbagh et al., 2009). Cependant, LKB1 possède un NLS en N-terminal qui lui permet de se localiser dans le noyau. Lorsque l'on surexprime LKB1, elle se localise principalement dans le noyau (Nezu et al., 1999). La cosurexpression de STRAD permet de transloquer LKB1 du noyau vers le cytoplasme (Boudeau et al., 2003).

Les PTM affectant LKB1 précédemment évoquées peuvent également réguler sa localisation cellulaire. (i) La prénylation est requise pour la localisation membranaire de LKB1 (Collins et al., 2000). (ii) La déacétylation de la lysine 48 par SIRT1 entraîne une augmentation du ratio LKB1 cytoplasmique/ LKB1 nucléaire, ce qui a pour conséquence l'activation de l'AMPK dépendante de LKB1. (iii) AKT phosphoryle LKB1 sur la sérine 334 et facilite donc sa liaison à la protéine 14.3.3, réduisant ainsi son interaction avec STRAD et induisant l'accumulation nucléaire de LKB1 (Liu et al., 2012b).

v. Fonctions de LKB1

LKB1 a pour principal substrat AMPK, pilier du métabolisme énergétique cellulaire. Suite à un stress cellulaire, LKB1 dans son complexe actif LKB1/STRAD/MO25 phosphoryle AMPK sur la

tyrosine 172 (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). La phosphorylation est le signal d'activation d'AMPK, qui permet le maintien de l'homéostasie énergétique, entraînant ainsi des effets à court terme en contrôlant l'activité de certaines enzymes et à plus long terme au niveau de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (pour revue (Hardie et al., 2007)). Des phosphatases telles que PP1, PP2A ou PP2C permettent la déphosphorylation de la tyrosine 172, régulant ainsi négativement l'AMPK. En plus d'AMPK α 1-2, d'autres kinases de la famille AMPK ont été identifiées pour être elles aussi des substrats de LKB1 : BRSK1-2, MARK1-4, NUAK1-2, SIK1-3 et SNRK (pour revue (Alessi et al., 2006)).

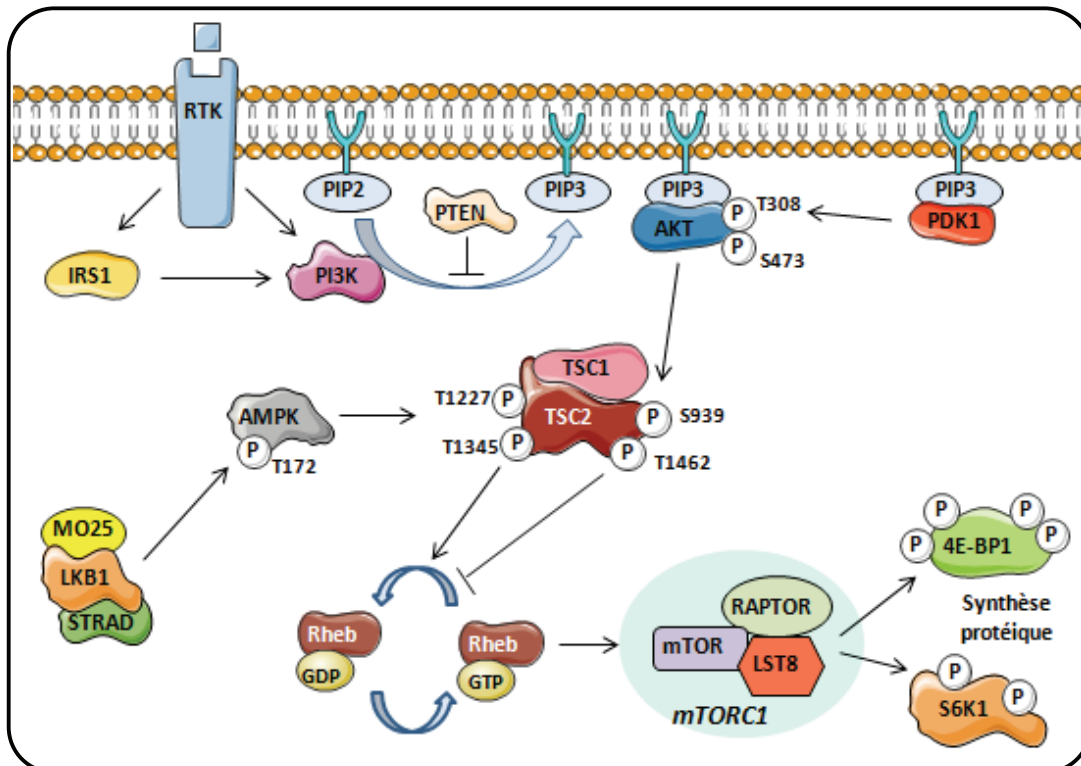


Figure 47 : Rôle de LKB1 dans la voie mTor

Le complexe LKB1/STRAD/MO25 phosphoryle AMPK ce qui induit l'inactivation de Rheb (Rheb-GDP), après phosphorylation de TSC2 par l'AMPK activée. Cela inhibe alors mTor et donc la synthèse protéique.

Contrôle du métabolisme et de la prolifération cellulaire.

LKB1, de part son rôle de suppresseur de tumeur, a la capacité de promouvoir à la fois l'arrêt de la synthèse protéique, du cycle cellulaire et de stimuler l'apoptose.

L'AMPK phosphoryle et active TSC-1/TSC-2. L'activation de ce complexe permet la conversion de Reb-GTP en Reb-GDP, empêchant ainsi l'activation de mTor. L'inactivation de mTor conduit à la déphosphorylation de ses effecteurs S6K1 et 4E-BP1 qui ne peuvent plus initier la traduction (**Figure 47**). Ce mécanisme permet à la cellule de conserver son énergie en condition de stress énergétique (Corradetti et al., 2004; Shaw et al., 2004).

L'AMPK activée par LKB1 contrôle aussi le métabolisme lipidique. En effet, l'AMPK va phosphoryler et inactiver l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). L'ACC catalyse la réaction qui permet

d'obtenir le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA dans le tissu adipeux et le foie (**Figure 48A**). Cette transformation est la première étape de la biosynthèse des acides gras (Park et al., 2002).

LKB1 peut aussi réguler le cycle cellulaire *via* p53. Après activation de l'AMPK ou de SIK1 par LKB1, p53 peut être directement phosphorylée par l'AMPK ou SIK1, sur la sérine 15 (**Figure 48B**). Cette phosphorylation induit l'expression de p21 et donc l'arrêt du cycle cellulaire (Marianne Tiainen et al., 2002). LKB1 est aussi impliquée dans la régulation de la mort cellulaire, que ce soit p53-dépendant *via* un mécanisme de sénescence cellulaire (Qanungo et al., 2003) ou p53-indépendant *via* un processus p73-dépendant (Jones et al., 2005).

Régulation des mouvements cellulaires

Chez les mammifères, LKB1 régule la polarité cellulaire. Suite à l'activation de LKB1 dans une cellule intestinale isolée, un remodelage du cytosquelette d'actine a été observé, aboutissant à la formation d'une bordure en brosse (Baas et al., 2003). Ces données, ainsi que l'apparition d'hamartomes intestinaux dans le PJS, indiquent que LKB1 possède un rôle majeur dans le contrôle de la polarité cellulaire.

Cet effet de LKB1 passerait entre autre par la phosphorylation par LKB1 des protéines de la famille MARK (microtubule affinity-regulating kinase) (Lizcano et al., 2004). Les kinases MARK peuvent phosphoryler les MAPs (microtubule associated proteins) diminuant ainsi la stabilité des microtubules (Drewes et al., 1997). De plus, les substrats de LKB1 ; BRSK1 et SIK2, se localisent sur les centrosomes, où BRSK1 induit la phosphorylation de la sérine 131 de la tubuline gamma (Alvarado-Kristensson et al., 2009) et SIK2 la phosphorylation de la sérine 2392 de la protéine centrosomale C-Nap1 (Ahmed et al., 2010) (**Figure 48C**). Ces évènements sont requis pour la duplication et la séparation du centrosome durant la mitose, respectivement.

Les kinases NUAK sont impliquées dans l'inhibition de la déphosphorylation de MLC (myosin regulatory light chain) impliquée dans la contractilité cellulaire, processus déterminant pour la migration cellulaire. Les protéines NUAK1 et 2 sont activées par LKB1. NUAK phosphoryle MYPT1, induisant ainsi la séquestration du complexe de phosphatase (PP1 et MYPT1) par 14.3.3 (Zagórska et al., 2010) (**Figure 48C**). De plus, l'association de NUAK2 avec MRIP augmente la phosphorylation de MLC et induit donc la formation de fibres de stress. Cette activité ne nécessite pas l'activité kinase de NUAK2, mais est dépendante de MRIP et MYPT1 (Vallenius et al., 2011).

LKB1 est impliquée dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) *via* la voie du TGF β . Le TGF β régule la polarité des cellules épithéliales et la différenciation en induisant l'EMT. Ce processus est important pour les cellules dans les processus de générations tissulaires mais est aussi impliqué dans la tumorigenèse (pour revue (Acloque et al., 2009)). Il a été démontré que LKB1 inhibe la voie du TGF β dans les cellules normales (**Figure 48D**). Deux mécanismes peuvent être impliqués dans cette régulation. (i) LKB1 phosphoryle et active SIK1, qui en s'associant à Smad7 inhibe TGF β RI, bloquant ainsi la voie du TGF β (Kowanetz et al., 2008). (ii) LKB1 phosphoryle Smad 4, ce qui affecte la liaison de Smad 4 à l'ADN. De plus, LKB1 se complexe avec LIP1 (LKB1 interacting protein 1) et Smad4, régulant négativement les gènes

cibles du TGFβ. Ces mécanismes conduisent à l'inhibition des gènes cibles du TGFβ et de ce fait à l'inhibition de l'EMT (Morén et al., 2011).

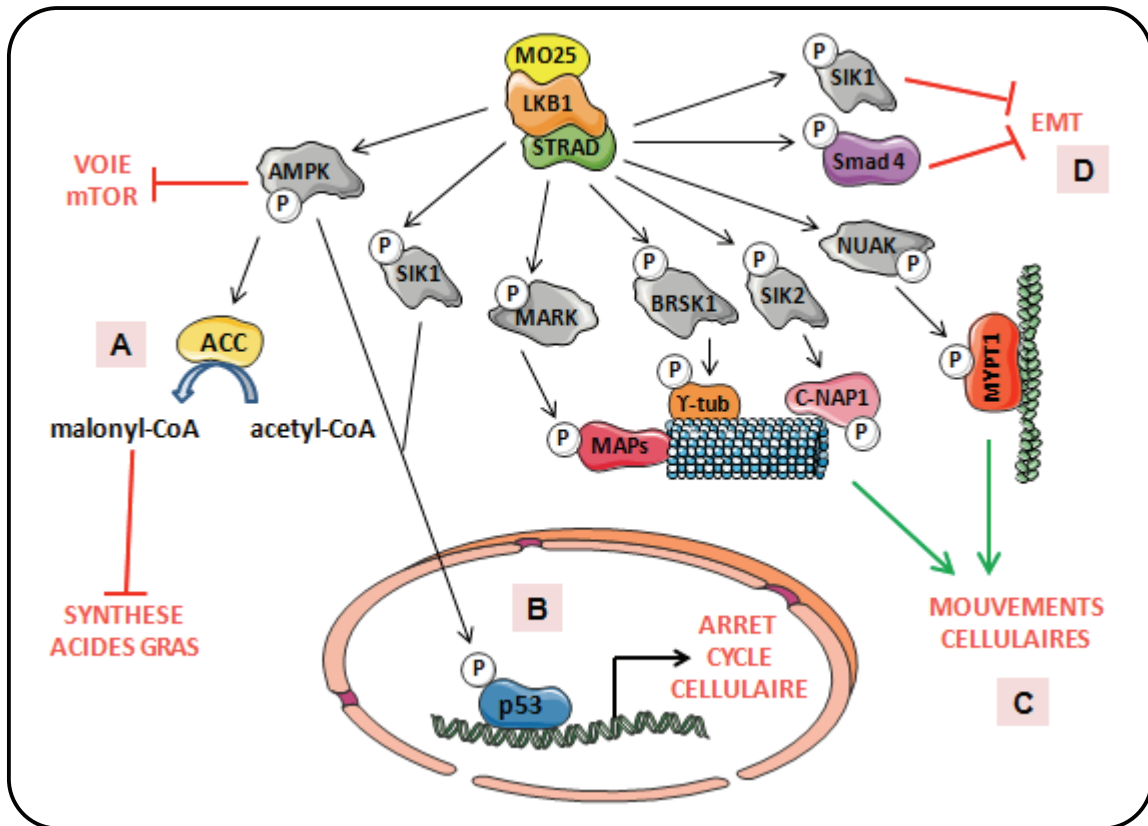


Figure 48 : Quelques effets anti-oncogéniques de LKB1

Dans les cellules, LKB1 forme un complexe actif avec STRAD et MO25. LKB1/STRAD/MO25 phosphoryle AMPK, qui peut alors à son tour inhiber la synthèse protéique (via l'inhibition de la voie mTor) ou la biosynthèse d'acides gras (A). Dans le noyau, l'AMPK ou SIK1 activés par LKB1 peuvent phosphoryler p53 et activer ses gènes cibles (B). LKB1 est aussi impliqué dans la régulation des mouvements cellulaires via la phosphorylation de ses substrats tels que MARK, BRSK1, SIK2 ou NUAK (C). Enfin, LKB1 inhibe la voie du TGFβ, qui régule entre autre l'EMT (D). Simplifié à partir de (Vaahromeri et al., 2011).

Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires de ERα, l'équipe de Sylvie Mader (IRIC, Université de Montréal) a réalisé un criblage double hybride chez la levure. Il a permis d'identifier LKB1 comme partenaire putatif de ERα (Sylvie Mader, Nader Hussein, Guila Dayan). Etant donné l'implication de LKB1 dans de nombreux processus cellulaires cytoplasmiques, nous avons étudié le mécanisme moléculaire par lequel LKB1 régule la signalisation médiée par ERα.

Différents modèles cellulaires ERα+ ont été utilisés : (i) la lignée MCF-7 issue d'un adénocarcinome mammaire, transfectée avec des vecteurs antiviraux shRNA dirigés contre LKB1 permettant l'inhibition stable de l'expression de LKB1, (ii) la lignée ZR-75.1 issue d'un adénocarcinome mammaire, transfectée avec ces mêmes vecteurs antiviraux shRNA dirigés

contre LKB1, (iii) la lignée Cama-1 isolée à partir d'une effusion pleurale maligne d'un site métastatique dérivant d'un adénocarcinome ; (iv) la lignée T47D issue d'une tumeur épithéliale canalaire et (v) la lignée CLB-Sav issue d'un cancer du sein, lignée générée au Centre Léon Bérard.

L'étude de l'expression de LKB1 a été réalisée au Centre Léon Bérard par immunohistochimie, sur 154 tumeurs humaines de patientes (*Dr Isabelle Treilleux*). Ces tumeurs font parties de la même cohorte que celles dont nous nous étions servis préalablement lors de l'étude du complexe mER α /Src/PI3K en Duolink (Poulard et al. 2012). La base de données du Centre permet de centraliser le suivi des patientes réalisé par les médecins (*Thomas Bachelot et al.*) et l'analyse statistique *en aval* est réalisée par l'UBET (Unité de biostatistique) (*Emilie Lavergne, Sylvie Chabaud*).

L'étude du rôle fonctionnel de l'interaction entre ER α et LKB1 dans la carcinogenèse mammaire a permis de montrer que LKB1 est un nouveau partenaire du complexe mER α /Src/PI3K, associé à un mauvais pronostic sur la survie des patientes. Ces résultats sont décrits dans l'article n°2 intitulé « *LKB1, a two-faced Janus marker of breast cancer* » (article soumis), sur lequel je suis co-premier auteur avec Katia Bouchekioua-Bouzaghrou.

b- Article 2

LKB1, a two-faced Janus marker of breast cancer

Katia Bouchekioua-Bouzaghrou*, **Coralie Poulard***, Juliette Rambaud-Arnaud, Emilie Lavergne,
Nader Hussein, Isabelle Treilleux, Marc Billaud, Thomas Bachelot, Sylvie Mader, Laura Corbo and
Muriel Le Romancer

** Egale contribution*

Article soumis à International Journal of Cancer.

LKB1, a two-faced Janus marker of breast cancer

*Katia Bouchekioua-Bouzaghrou^{1,2,3,4,5}, *Coralie Poulard^{1,2,3,4,5}, Juliette Rambaud^{1,2,3,4,5}, Emilie Lavergne⁶, Nader Hussein⁷, Marc Billaud⁸, Thomas Bachelot⁹, Sylvie Chabaud⁶, Sylvie Mader⁷, Guila Dayan⁷, Isabelle Treilleux^{1,2,3,4,5,10}, Laura Corbo^{1,2,3,4,5} and Muriel Le Romancer^{1,2,3,4,5}

* Authors participated equally to the work

1 Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

2 Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

3 Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

4 CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

5 Equipe Labellisée « La Ligue »,

6 Centre Léon Bérard, Biostatistics Unit, F-69000 Lyon, France

7 Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada;

8 Institut Albert Bonniot, CRI INSERM/UJF U823, Grenoble, France.

9 Centre Léon Bérard, Dpt of Medical Oncology, F-69000 Lyon, France

10 Centre Léon Bérard, Pathology Dpt, F-69000 Lyon, France

Address for all correspondence : Muriel Le Romancer, CRCL, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Bâtiment D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: 00 33 4 78 78 28 22. E-mail: muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

Keywords: Estrogen receptor α , Breast cancer, Estrogen signaling, LKB1, Biomarker.

Abbreviated title: LKB1, a marker of breast cancer

Disclosure of Potential Conflicts of Interest:

No potential conflicts of interest were disclosed.

Novelty:

Our work shows striking evidence that LKB1, classically known as a tumor suppressor protein can acquire oncogenic properties in certain circumstances. It seems that its dual function could be due to its localization within tumoral cells (cytoplasmic versus nuclear localization). LKB1 could then constitute a new biomarker of breast tumours.

ABSTRACT

Although the presence of nuclear estrogen receptor is widely used to guide breast cancer therapy, less attention has been paid to the receptor cytoplasmic signaling. Recently we have shown that this pathway is operative *in vivo* and is activated in aggressive tumours representing a new potential target for breast cancer therapy. Here, we identified LKB1 as a partner of ER α and we explored its potential role in estrogen nongenomic signaling. The associations between LKB1 expression and the actors of this pathway, namely the methylated form of ER α (metER α), Src and PI3K, have been analyzed both in cultured cells and in 154 primary breast tumour samples. We found that LKB1 is a component of the cytoplasmic signaling complex in breast cell lines as well as in primary breast tumours. Moreover, an inverse correlation between the localization of LKB1 in nuclear and cytoplasmic compartments is observed. Importantly, high expression of cytoplasmic LKB1 is an independent marker of poor prognosis, associated with reduced overall survival (OS) and disease free survival (DFS). Conversely, the presence of nuclear LKB1 associates with increased OS and DFS.

In conclusion, our results highlight that LKB1 expression in breast cancer appears to have opposite effects depending on its sub-cellular localization and may be used as a new prognostic biomarker.

INTRODUCTION

The biological actions of estrogen are mediated through ER α and ER β which function in the nucleus as ligand-dependent transcription factors. In addition to well-documented effects on transcription, estrogen can activate signal transduction cascades outside of the nucleus (i.e., nongenomic signaling) (1). In this process, ER α interacts directly with various proteins kinases to form protein complexes triggering the activation of downstream molecules such as Akt (2-4). Our team contributed to the understanding of this pathway by the demonstration that arginine methylation of the receptor on arginine260 (called metER α) is a prerequisite for estrogen-induced formation of the ER α /Src/PI3K complex which activates Akt (5;6). Recently, we showed that this pathway is activated in aggressive breast tumours and could constitute a new potential target for therapy (7).

In order to understand the regulation of estrogen nongenomic signaling, we looked for new partners of metER α . In this report, we found that the protein LKB1 is part of the complex containing metER α /Src/PI3K. LKB1, encoded by the *STK11* gene, is a master kinase that acts as a key regulator of cell polarity, energy metabolism and mTOR signaling (8-10). Germline mutations of LKB1 are responsible for Peutz-Jeghers syndrome (PJS) (11), a dominantly-inherited disease characterized by gastrointestinal polyps and pigmented macules (12). PJS patients have an increased risk of developing various cancers with a 54% greater risk of developing breast cancer (13-15). In addition, somatic inactivation of LKB1 has been associated with sporadic cancers such as lung cancer (16).

In this work, we established a link between LKB1 and metER α *in vitro* and *in vivo* in primary breast tumours highlighting a new concept that in certain circumstances, LKB1 could lose its oncosuppressive properties and become a marker of aggressiveness.

MATERIAL AND METHODS

Library Screen

To identify genes encoding proteins that interact with DEF domain of ER α , we used the two hybrid system to detect interactions via the reconstitution of a functional transcription factor in yeast. ER α fused to Lex A-DBD was used to transform cells with the VP16 transactivation domain-tagged Ishikawa cDNA library. The two hybrid screen was performed in an L40 yeast strain (auxotrophic for Trp1, Leu2, and His3 and mutated for β -Galactosidase). The interaction between ER α and proteins encoded by the cDNA library was performed in the presence of 500 nM E₂ and 40 mM 3-amino-1,2,4 triazole using His3 and β -Galactosidase selection markers.

LKB1 Stable Knockdown Using Lentiviral Short Hairpin RNA

Three pre-made lentiviral short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting human LKB1 and one negative control constructs created in the same vector backbone (pLKO.1-Puro) were purchased from SIGMA. To select for the MCF-7 and ZR75-1 cells that were stably expressing

shRNA constructs, cells were plated at a 1×10^6 density in 10 cm dishes and infected with virus-containing media with multiplicities of infection (MOI) of 1, 2, 5 and 10, and 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene. Puromycin selection (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was started 48 h after lentiviral infection.

Glutathione transferase (GST) Pull-Down Assay

ER α or LKB1 expression plasmid was transcribed and translated *in vitro* by using T7-coupled reticulocyte lysate in the presence of [^{35}S] methionine. Labeled proteins were incubated with 10 μg of purified recombinant GST- fusion proteins in 200 μl of binding Buffer (Tris 20 mM pH7,4, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Glycerol 10%, Igepal 0,25%) with 1 mM DTT and 1% milk) for 2 hr at room temperature. After washing, bound proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and visualized by autoradiography.

Cell culture and transfections.

All the human cell lines were maintained at 37°C in the appropriate medium supplemented with 10% fetal calf serum. Prior to experiments, cells were grown for 48 hr in phenol red-free DMEM and 10% charcoal-treated serum (Biowest).

The siRNA sequences targeting PRMT1 correspond to the coding regions 650-668 and have already been described (5). 50 nM of PRMT1 specific siRNAs or the scramble siRNA (Eurogentec) were transfected into MCF-7 cells (1×10^6) using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. 72 hr after transfection, proteins were analyzed.

Antibodies

| Antibody | Compagny | Species | Dilution for WB | Dilution for PLA |
|---------------------|----------------|---------|-----------------|------------------|
| ER α #04-820 | Millipore | Rabbit | 1/1000 | |
| ER α sc8005 | Santa cruz | Rabbit | | 1/75 |
| PRMT1 #07-404 | Upstate | Rabbit | 1/4000 | |
| PI3K p85 #06-195 | Upstate | Rabbit | 1/9000 | 1/150 |
| PI3K p85 ab-22653 | Abcam | Mouse | | 1/30 |
| c-Src sc-8056 | Santa Cruz | Mouse | 1/1000 | 1/150 |
| LKB1 #3050 | Cell signaling | Rabbit | 1/1000 | |
| LKB1 sc-32245 | Santa Cruz | Mouse | 1/1000 | 1/100 |
| LKB1 #1092 | Millipore | Rabbit | 1/1000 | |
| LKB1 ab-58786 | Abcam | Rabbit | | 1/50 |
| p-LKB1 AB16956 | Abnova | Rabbit | 1/1000 | |
| p-AKT (S473) #9271 | Cell signaling | Rabbit | 1/1000 | |
| AKT #9272 | Cell signaling | Rabbit | 1/1000 | |

Immunoprecipitation and western blotting

To study the effect of estrogen, cells were treated for different times with E $_2$ (10^{-8}M) (Sigma). When stated, cells were treated with Src inhibitor PP1 or with a peptide inhibiting ER α /Src

interaction (17). After treatment, cells were lysed using RIPA buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% deoxycholate) supplemented with protease inhibitor tablets (Roche Molecular Biochemicals) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM β-glycerophosphate). Protein extracts were incubated with primary antibodies overnight at 4°C with shaking. Protein A-Agarose or protein L-Agarose beads were added and the mixture was incubated 1 hr at 4°C. The immunoprecipitates were separated on SDS-PAGE. The proteins were visualized by ECL (Roche Molecular Biochemicals).

Immunohistochemical Staining

Paraffin embedded tumours tissue fixed in Formalin were used for analysis. The pathologist selected representative areas from breast invasive carcinomas. Triplicates from each tumour were inserted in a TMA block which contained 40 tumours. Four TMA (160 tumours) were analyzed. The blocks containing invasive carcinoma were serially sectioned at a thickness of 4 μm. After deparaffinization and rehydration, tissue sections were boiled in 10 mM citrate buffer pH6 at 97°C for 40 min. For blocking endogenous peroxidases, the slides were incubated in 5% hydrogen peroxide in sterile water. The slides were then incubated at room temperature for one hour with the anti-LKB1 rabbit or with the anti-P-4E-BP1 antibody (9451, Cell Signaling Technology). The, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin peroxidase conjugate (Envision Flex kit Ref: K800021-2, Dako). Bound antibody was revealed by adding the substrate 3, 3-diamino benzidine. Sections were counterstained with hematoxylin.

Proximity ligation assay

This technology developed by Olink Bioscience (Sweden) allows visualizing protein/protein interactions *in situ* and has been firstly published in 2006(18).

Fluorescence revelation

Cells were grown on coverslips into 12-well plates, and then fixed in methanol for 2 min, washed twice in PBS. Firstly, the samples were saturated using the blocking solution, then different couples of primary antibodies (rabbit and mouse in our case) were incubated 1h at 37°C. After washes, the PLA minus and plus probes (containing the secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides) were added and incubated 1h at 37°C. After the ligation of oligonucleotides the addition of nucleotides and polymerase, allows amplification by rolling-circle amplification (RCA) reaction using the ligated circle as a template during an incubation of 100 min at 37°C. The amplification solution also contains fluorescently labeled oligonucleotides that hybridize to the RCA product. Afterwards, the samples were mounted with Duolink II Mounting Medium containing Dapi, and then analyzed on fluorescence microscope.

In the case of LKB1 localization, we used the “Single Detection Method” that consists in using only one primary antibody, then PLA rabbit minus and rabbit plus probes containing the secondary antibody conjugated with complementary oligonucleotides were used. The next steps are similar to the protocol described above.

Brightfield Revelation

For TMA analysis, we used another revelation kit (Duolink II Brightfield) that allows detecting the signal by colorimetry under visible light. The first step is to avoid peroxidase quenching incubating the samples 5 min at room temperature, with a hydrogen peroxide solution. The following steps are identical to what was described before. For the detection, the probes are labeled with horseradish peroxidase after two washes in high purity water; nuclear staining solution is added on slides and incubated 2 min at room temperature. After washing the slides 10 min on running tap water, the samples were dehydrated in ethanol, then in xylene solution. Samples were mounted in non-aqueous mounting medium and then analyzed with a Bright field microscope.

Image acquisition and analysis

The hybridized fluorescent slides were viewed under a Leica DM6000B microscope. Images were acquired under identical conditions at objective X63. On each samples, one hundred cells were counted. Analyses and quantifications of these samples were performed using Image J software (free access). This software allows counting dots on 8 bits image. The plugin "Counter cells" allows analyzing cells number.

Human breast cancer samples collection

The tumours from 154 CLB patients with invasive non-metastatic breast cancer whose clinical and biological data were available from the regularly updated institutional database were analyzed. Written informed consent was obtained from each patient. The study protocol was approved by the institutional ethics committee. Patient's characteristics are presented in Table S1

Statistical analysis

Correlation analysis

Correlations between LKB1 and ER α /Src, ER α /PI3K, metER α /ER α expression were performed using Student T-test to compare quantitative expression of PLA interactions between LKB1 classes' expression.

Descriptive analysis

Clinical parameters's distributions (cancer subtype, clinical, histological and immunohistochemical data) were compared between LKB1 cytoplasmic or nuclear expression's level, using Pearson's χ^2 test or Fisher's exact test.

Survival analysis

Overall Survival (OS) defined as time from diagnosis to death or date of last follow-up and Disease Free Survival (DFS) defined as time from diagnosis to death or relapse or date of last follow-up (for censored patients) were studied.

Survival distributions were estimated by Kaplan-Meier method and compared between expression's level groups using the Log-Rank test.

To evaluate a possible relationship between survival outcomes (OS and DFS) and LKB1 expression, univariate Cox proportional hazard regression models were built by considering LKB1 expression and some covariates, approved to be prognostic (age and menopausal status at diagnosis, tumour size, lymph node status, ER, PR, HER2 status and SBR grade). All interactions between variables (significant at 10%) were tested and only significant ones ($p \leq 0.05$) were entered in the initial multivariate Cox model in addition to variables statistically significant in univariate analysis at 10% level. A backward manual selection procedure was used to lead to the final model by removing non significant variables ($p > 0.05$). All statistical analyses were performed using SAS[®] software, v 9.3 (SAS institute Inc, Cary, NC, USA).

RESULTS

LKB1 is a new partner of metER α

A yeast two-hybrid screen with ER α identified LKB1 as a partner of the receptor (Fig. S1a), in agreement with results obtained by Marignani's group (19).

We used *in vitro* GST pull-down assays to study the interaction between LKB1 and ER α and determine the domains involved (Fig. 1a and Fig. S1b, S1c and S1d). Next, we validated the binding between endogenous LKB1 and ER α by performing reciprocal immunoprecipitation on MCF-7 cells treated with E₂ for the indicated times (Fig. 1b and S2a). No protein interactions were detected in the absence of hormone stimulation, whereas estrogen treatment induced rapid and transient interaction between ER α and LKB1. Interestingly, the kinetics of interaction were reminiscent of those previously described for ER α methylation (5), suggesting that LKB1 could interact with metER α . Several results supported this hypothesis: i) siRNA-mediated reduction of the arginine methyltransferase PRMT1 responsible for ER α methylation, impaired both ER α methylation and ER α /LKB1 interaction (Fig. 1c), ii) both ER α methylation which is dependent on Src activity, and ER α /LKB1 interaction was strongly decreased upon treatment with the Src inhibitor PP1 (Fig. S2b), iii) depletion of metER α by immunoprecipitation also disrupted LKB1/ER α interaction (Fig. 1d), iv) cell treatment with a peptide that disrupts both ER α /Src interaction and ER α methylation, also abolished ER α /LKB1 interaction (17)(Fig. S2c) and finally, v) analysis in other tumoural breast cell lines showed that the interaction of ER α with LKB1 is restricted to cells expressing metER α , reinforcing the idea that LKB1 interacts specifically with metER α (Fig. S3).

LKB1 is a member of the complex containing metER α /Src/PI3K

In light of these results, we speculated that LKB1 could be a component of the cytoplasmic metER α /Src/PI3K signaling complex (5). To address this hypothesis, we performed co-immunoprecipitation experiments on E₂-treated cells. We found that the kinetics of interactions of ER α , Src and PI3K with LKB1 were concomitant with the kinetic of ER α methylation (Fig. 2a). Immunoprecipitation with a Src antibody confirmed the presence of LKB1 in the complex (Fig. 2a, lower panel). We then examined to what extent and in which

compartment these interactions occurred in cells. Using different antibody pairs, we studied the interaction of LKB1 with ER α , Src and PI3K using the proximity ligation assay technique. Fig. 2b shows that LKB1 interacted with ER α (panel a), PI3K (panel c) and Src (panel e) in the cytoplasm of MCF-7 cells, as indicated by the presence of red dots. The interactions were quantified by counting the number of dots per cell (Fig. 2c). The signals strongly decreased in MCF-7 cells in which expression of LKB1 was downregulated (Fig. 2b, panels b, d, f and Fig. 2c). These interactions were also confirmed by *in vitro* GST pulldown experiments (Fig. 2d). Despite these results indicate that LKB1 interacts with the cytoplasmic complex triggering estrogen rapid signaling, LKB1 knockdown in MCF-7 and ZR-75 cells did not affect neither ER α methylation (Fig. S4a and S4c) nor the integrity and localization of the ER α /Src/PI3K complex (Fig. S4b and S4d). Consistently, the E₂-dependend downstream Akt activation was unchanged in these cells (Fig. S4a and S4b). On the basis of these results, we can postulate that LKB1 does not act as an integral subunit of the E₂ signalling “core” complex, crucial for its integrity or stability, but most likely as an auxiliary tethered composant.

Expression of LKB1 in breast tumours

We next examined the relationship between LKB1 expression and the activation of estrogen nongenomic signaling on 154 breast cancer samples, already analyzed for this pathway (7). We first validated the specificity of the LKB1 antibody for immunohistochemical experiments on several breast tumor samples (Fig. S5a and b). The analysis of IHC experiments revealed varied levels of LKB1 expression with faint to intermediate and strong staining (Figure 3a, compare panel a to panels b and c) and provides evidence for a predominant cytoplasmic localization compared to nuclear localization (Table S2). Interestingly, an inverse correlation between LKB1 expressions in both compartments was found (Fig. 3b). Moreover, LKB1 cytoplasmic expression correlated with ER α /PI3K interaction (p=0.081), ER α /Src interaction (p=0.028) and metER α /ER α expression measured by PLA (p=0.079) (Fig. 3c). Conversely, nuclear LKB1 expression did not correlate with the activation of estrogen nongenomic signaling (Fig. 3d). Finally, using PLA, we were able to demonstrate the interaction of LKB1 with PI3K, Src and ER α in the cytoplasm of tumour cells (Fig. S6, panels a, b and c). We did not detect any of these interactions in a tumour that does not express LKB1 (Fig. S6, panels d, e and f). These findings confirmed our *in vitro* data suggesting that cytoplasmic LKB1 is involved in E₂ nongenomic signaling.

Previous studies showed that LKB1 is distributed between the cytoplasm and nucleus. However mechanisms regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of endogenous LKB1 have been limited by a lack of efficient antibodies for immunofluorescence (20-22). To circumvent this limitation we used a PLA derived technique, the “Single Detection method” (see the Method’s section) to analyze the cellular localization of endogenous LKB1. As shown in Fig. S7a, LKB1 is mainly detected in the cytoplasm of MCF-7 cells whereas in ZR75-1, its localization is mainly nuclear (compare with control cells: panels a, c versus shLKB1 cells, panels b,d). The signals were strongly decreased when LKB1 expression was knocked down using siRNA in both cell lines, supporting the specificity of this detection (Fig. S7d and S7c). The analysis of additional cell lines confirmed the LKB1 dual localization (Fig. S8a). Of interest, phosphorylation of Ser334 has previously been linked to the nuclear retention of LKB1 (23). Immunoblot studies, using anti-

LKB1^{ser334} antibody, showed a tight correlation between LKB1 phosphorylation and its nuclear localization (compare Fig. S8a and S8b).

LKB1, a marker of prognosis in breast cancer

We next analyzed the association between LKB1 expression and clinical parameters. We found that high LKB1 cytoplasmic expression was associated with high SBR grade tumours ($p=0.024$) and with negative ER α status: 6.5% of ER α negative tumours with low expression of LKB1 (intensity 0,1) compared to 21,7 % of ER α negative tumours with a high expression of LKB1 (intensity 2,3). Consequently, LKB1 expression was inversely associated with luminal A tumours ($p=0.031$) (Table 1). Thus, high levels of LKB1 expression in the cytoplasm was associated with less favorable prognostic factors while high LKB1 nuclear expression was associated with smaller tumour size, ($p=0.067$), PR ($p= 0.064$) and ER α positive status ($p=0.004$) (Table 2).

Regarding patient outcome according to univariate analysis, high cytoplasmic LKB1 expression was significantly associated with poor overall survival (OS, Log Rank $p=0.012$) and disease-free survival (DFS, $p=0.028$) (Fig. 4a and Fig. S9a). Conversely, high nuclear LKB1 expression was significantly associated with longer OS ($p=0.037$) and DFS ($p=0.032$) (Fig. 4b and Fig. S9b). Multivariate analyses revealed that a high cytoplasmic expression of LKB1 remained an independent poor prognostic factor for both OS and DFS (Fig. 4c and Fig. S9c), which is not the case for LKB1 nuclear expression. Then, tumours strongly expressing LKB1 in the cytoplasm with no nuclear LKB1 were associated with the worst survival rates in terms of both OS ($p=0,003$) and DFS ($p=0,005$) (Fig. S10a S10b, S10c and S10d). The same analysis restricted to ER α - positive breast tumours ($n= 134$) confirmed these results (Fig. S11a, S11b, S11c and S11d).

On the same tumours we analyzed the phosphorylation of 4E-BP1, a regulator of translation which is a direct target of mTOR. Interestingly, we found a positive correlation between the level of 4E-BP1 phosphorylation and cytoplasmic LKB1 expression (Fig. 4d), suggesting that LKB1 is not able to exert its inhibitor effect on mTOR signaling as already described (24;25).

DISCUSSION

In this study, we describe for the first time a role of LKB1 in the estrogen's extra-nuclear signaling. Our data clearly establish by *in vitro* and *in vivo* approaches that LKB1 specifically interact with the methylated form of ER α , which we described to trigger the formation of the cytoplasmic complex(es) leading to the activation of downstream signaling kinases. (5;6). Accordingly, using PLA we have shown that the interaction of LKB1 with this complex occurs in the cytoplasm of the breast cell line MCF7 (Fig. 2b). LKB1 has already been linked to estrogen receptor signaling acting as ER α coactivator regulating its transcriptional activity (19) Our results are consistent with an emerging concept supporting that some coregulators of ER α can integrate genomic and nongenomic signaling pathways, as it is the case of PELP1, acting as ER α transcriptional regulator and as adaptor between ER α and Src and thereby regulates E₂-induced downstream ERK/MAPK cascades (26).

We then analyzed by immunochemistry the localization and the staining pattern of LKB1 in 154 invasive non-metastatic breast cancers in which the status the estrogen non genomic signaling had previously been assessed (7). The dual purpose of this analysis was to associate LKB1 expression with the activation of estrogen nongenomic signaling as well as with other clinical parameters. The results of this study allow us many relevant conclusions. First, we find that LKB1 localized, in the cytoplasm as well as in the nucleus of tumoral cells. Interestingly, both expressions are inversely correlated (see Figure 3b). This dual localization was confirmed in several breast cell lines. Based on published data suggesting that LKB1 could be specifically targeted to the nucleus by the phosphorylation of Ser334 (23), we observed a correlation between the phosphorylation of LKB1 on Ser 334, and its nuclear localization (Fig. S8a and S8b). However, we could not confirm this correlation in tumour samples due to the lack of efficiency of the phospho-antibody in IHC.

Concerning the expression of LKB1 in the cytoplasm we confirmed in breast tumour samples the results obtained in breast cell lines. In fact we have shown a significant correlation between the presence of cytoplasmic LKB1 and nongenomic complex supporting its involvement in E₂ nongenomic signaling

Interestingly the dual localization of LKB1 correlated with opposite clinical parameters. Whereas, LKB1 cytoplasmic expression is correlated with bad prognosis markers, nuclear LKB1 is associated with good prognosis markers. Moreover, high LKB1 cytoplasmic expression is an independent marker of poor survival contrary to its nuclear expression. These results appears conflicting with early studies showing that LKB1 suppresses breast cancer cell migration and invasion *in vitro*, tumour growth and lung metastasis *in vivo* (27;28) and that a conditional deletion of LKB1 in the mouse mammary gland induced tumour formation (29). Furthermore, it has been described that low LKB1 expression in breast cancer samples was associated with poorer histological grade, presence of lymph node metastasis and a shorter survival (30). The subcellular localization of LKB1 might be responsible, at least in part, for these conflicting observations. In particular, in the above study Shen and al analyzed the expression of LKB1 from frozen tumour samples by western blotting, so the heterogeneity of the tumours as well as the localization of LKB1 within the cell was not taken in account.

Our results also show that high levels of LKB1 in the cytoplasm of breast tumour cells associate with less favorable prognostic factors. We can suppose that, as largely described for a wide variety of epithelial cancers. LKB1 is mutationally inactivated in these tumours. However, despite the strong association between LKB1 mutations and increased risk of carcinogenesis in PJS, LKB1 is not commonly mutated somatically in primary sporadic breast carcinomas (16;31;32). Given that the high level of cytoplasmic LKB1 correlates with the activation of estrogen nongenomic signaling, it is tempting to speculate that the metER α /Src/PI3K cytosolic complex can interact with and sequester LKB1, leading to its functional inactivation. We also analyzed the expression of P-4E-BP1 a target of mTOR, known to be activated upon LKB1 knockdown (25). Very interestingly, the activation of 4E-BP1 correlates with cytoplasmic LKB1 expression comforting our hypothesis that LKB1 is functionally inactivated in these tumours, being unable to down regulate mTOR signaling and thereby to inhibit cell growth.

On the other hand, we cannot rule out that LKB1 pathway can also have an unexpected positive role in tumorigenesis, as recently reported (33). In addition, LKB1 has been shown to be required for preventing apoptosis in cells over-expressing Akt (34).

In conclusion, these findings establish a bimodal mechanism for LKB1 in breast tumours, based on its subcellular localization. We also established a link between LKB1 and the rapid estrogen signaling. We can hypothesize that the interaction of LKB1 with the metER α /Src/PI3K complex could transform this tumour suppressor into a putative marker of breast cancer aggressiveness.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank G. Castoria for the ER α peptides, C. Caux for CLB-SAV cells, C. Languilaire, S. Goddard-Léon, A. Colombe and AP Morel for technical support. This study was partially supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), the “Fondation Arc Cancer” (ARC) and Fondation de France (FDF). CP was supported by the French Ministry of Research and by ARC, KBB by the LNCC and JR by FDF.

REFERENCE LIST

- (1) Le Romancer M., Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocr Rev* 2011 Jun 15.
- (2) Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001 Nov 1;20(21):6050-9.
- (3) Hammes SR, Levin ER. Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 2011 Dec;152(12):4489-95.
- (4) Song RX, Zhang Z, Santen RJ. Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src. *Trends Endocrinol Metab* 2005 Oct;16(8):347-53.
- (5) Le Romancer M., Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008 Jul 25;31(2):212-21.
- (6) Le Romancer M., Treilleux I, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L. Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 2010 Aug;75(8-9):560-4.

- (7) Poulard C, Treilleux I, Lavergne E, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard-Leon S, Chabaud S, Tredan O, Corbo L, Le RM. Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol Med* 2012 Oct 15.
- (8) Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-dependent signaling pathways. *Annu Rev Biochem* 2006;75:137-63.
- (9) Forcet C, Billaud M. Dialogue between LKB1 and AMPK: a hot topic at the cellular pole. *Sci STKE* 2007 Sep 18;2007(404):e51.
- (10) Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 2004 Jul;6(1):91-9.
- (11) JEGHERS H, MCKUSICK VA, KATZ KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med* 1949 Dec 29;241(26):1031-6.
- (12) Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998 Jan 8;391(6663):184-7.
- (13) Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, Offerhaus JA. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000 Dec;119(6):1447-53.
- (14) Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, Keller JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res* 2006 May 15;12(10):3209-15.
- (15) van Lier MG, Westerman AM, Wagner A, Looman CW, Wilson JH, de Rooij FW, Lemmens VE, Kuipers EJ, Mathus-Vliegen EM, van Leerdam ME. High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Gut* 2011 Feb;60(2):141-7.
- (16) Launonen V. Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Hum Mutat* 2005 Oct;26(4):291-7.
- (17) Varricchio L, Migliaccio A, Castoria G, Yamaguchi H, de FA, Di DM, Giovannelli P, Farrar W, Appella E, Auricchio F. Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol Cancer Res* 2007 Nov;5(11):1213-21.
- (18) Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 2006 Dec;3(12):995-1000.
- (19) Nath-Sain S, Marignani PA. LKB1 catalytic activity contributes to estrogen receptor alpha signaling. *Mol Biol Cell* 2009 Jun;20(11):2785-95.
- (20) Dorfman J, Macara IG. STRADalpha regulates LKB1 localization by blocking access to importin-alpha, and by association with Crm1 and exportin-7. *Mol Biol Cell* 2008 Apr;19(4):1614-26.

- (21) Sebbagh M, Santoni MJ, Hall B, Borg JP, Schwartz MA. Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin. *Curr Biol* 2009 Jan 13;19(1):37-42.
- (22) Zhan YY, Chen Y, Zhang Q, Zhuang JJ, Tian M, Chen HZ, Zhang LR, Zhang HK, He JP, Wang WJ, Wu R, Wang Y, et al. The orphan nuclear receptor Nur77 regulates LKB1 localization and activates AMPK. *Nat Chem Biol* 2012 Nov;8(11):897-904.
- (23) Liu L, Siu FM, Che CM, Xu A, Wang Y. Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. *Am J Transl Res* 2012;4(2):175-86.
- (24) Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2007 Nov 15;67(22):10804-12.
- (25) Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 2004 Jul;6(1):91-9.
- (26) Vadlamudi RK, Manavathi B, Balasenthil S, Nair SS, Yang Z, Sahin AA, Kumar R. Functional implications of altered subcellular localization of PELP1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 2005 Sep 1;65(17):7724-32.
- (27) Taliaferro-Smith L, Nagalingam A, Zhong D, Zhou W, Saxena NK, Sharma D. LKB1 is required for adiponectin-mediated modulation of AMPK-S6K axis and inhibition of migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2009 Jul 23;28(29):2621-33.
- (28) Zhuang ZG, Di GH, Shen ZZ, Ding J, Shao ZM. Enhanced expression of LKB1 in breast cancer cells attenuates angiogenesis, invasion, and metastatic potential. *Mol Cancer Res* 2006 Nov;4(11):843-9.
- (29) McCarthy A, Lord CJ, Savage K, Grigoriadis A, Smith DP, Weigelt B, Reis-Filho JS, Ashworth A. Conditional deletion of the *Lkb1* gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. *J Pathol* 2009 Nov;219(3):306-16.
- (30) Shen Z, Wen XF, Lan F, Shen ZZ, Shao ZM. The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002 Jul;8(7):2085-90.
- (31) Bignell GR, Barfoot R, Seal S, Collins N, Warren W, Stratton MR. Low frequency of somatic mutations in the LKB1/Peutz-Jeghers syndrome gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 1998 Apr 1;58(7):1384-6.
- (32) Forster LF, Defres S, Goudie DR, Baty DU, Carey FA. An investigation of the Peutz-Jeghers gene (LKB1) in sporadic breast and colon cancers. *J Clin Pathol* 2000 Oct;53(10):791-3.
- (33) Jeon SM, Chandel NS, Hay N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* 2012 May 31;485(7400):661-5.
- (34) Zhong D, Liu X, Khuri FR, Sun SY, Vertino PM, Zhou W. LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins. *Cancer Res* 2008 Sep 15;68(18):7270-7.

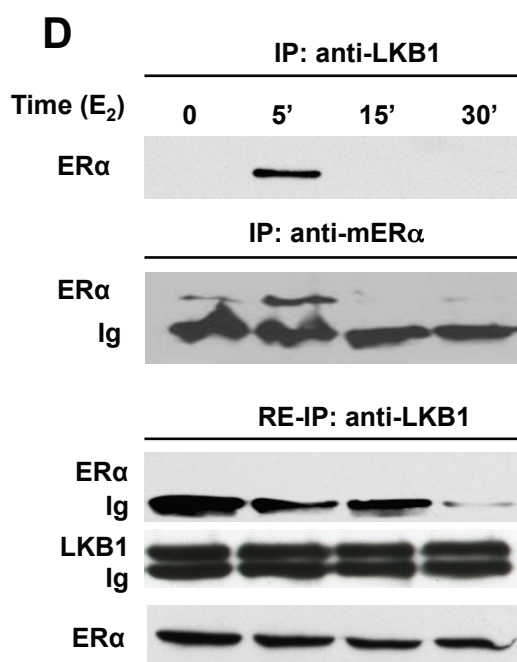
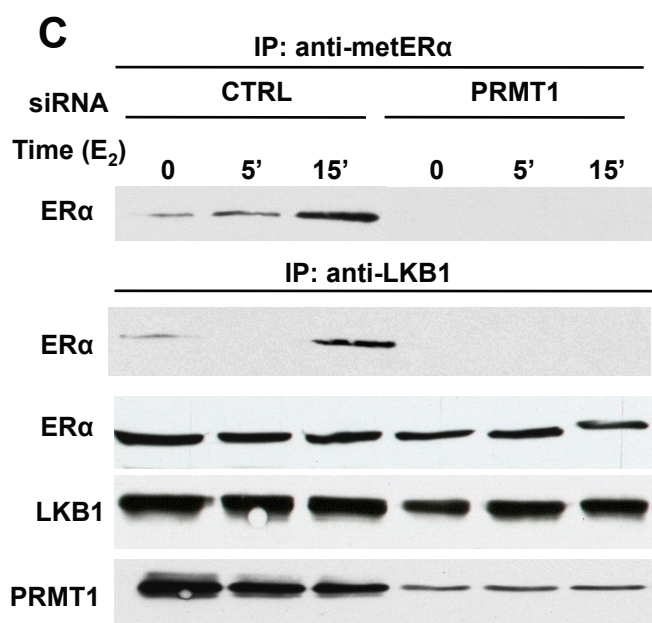
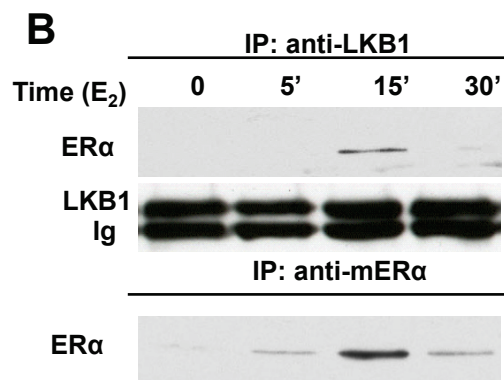
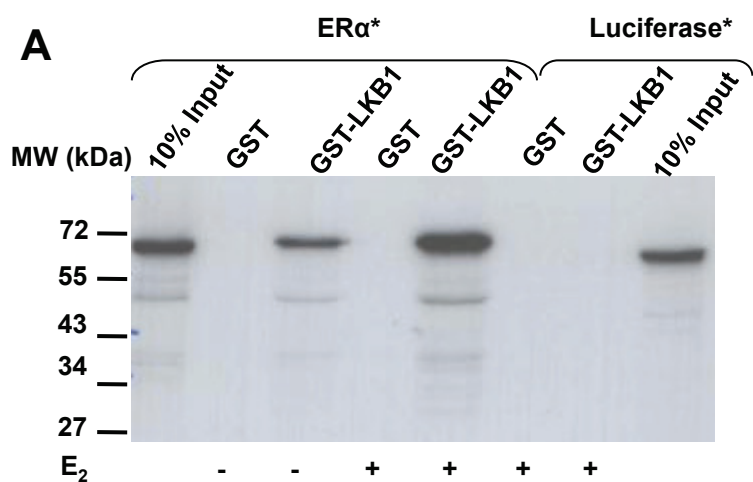


Figure 1

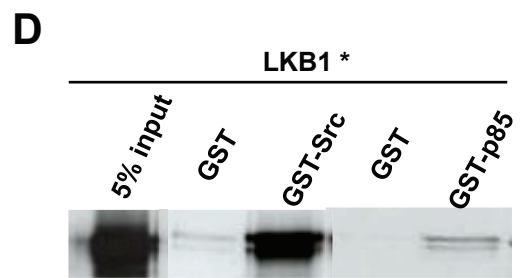
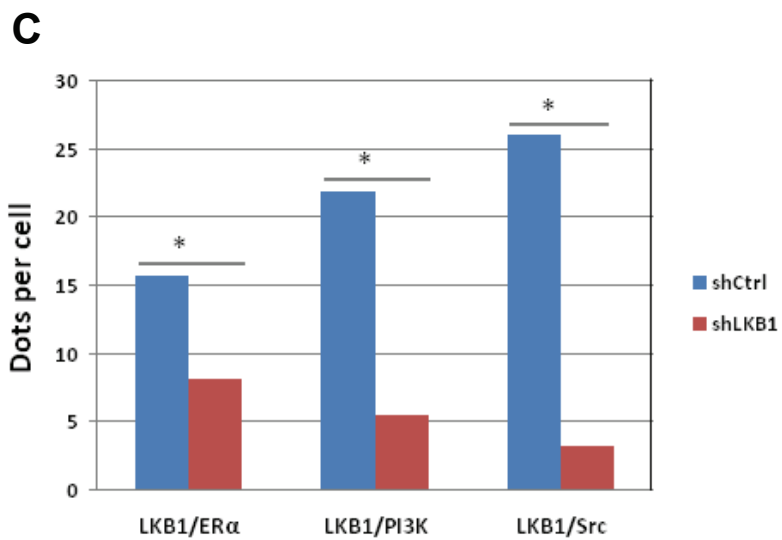
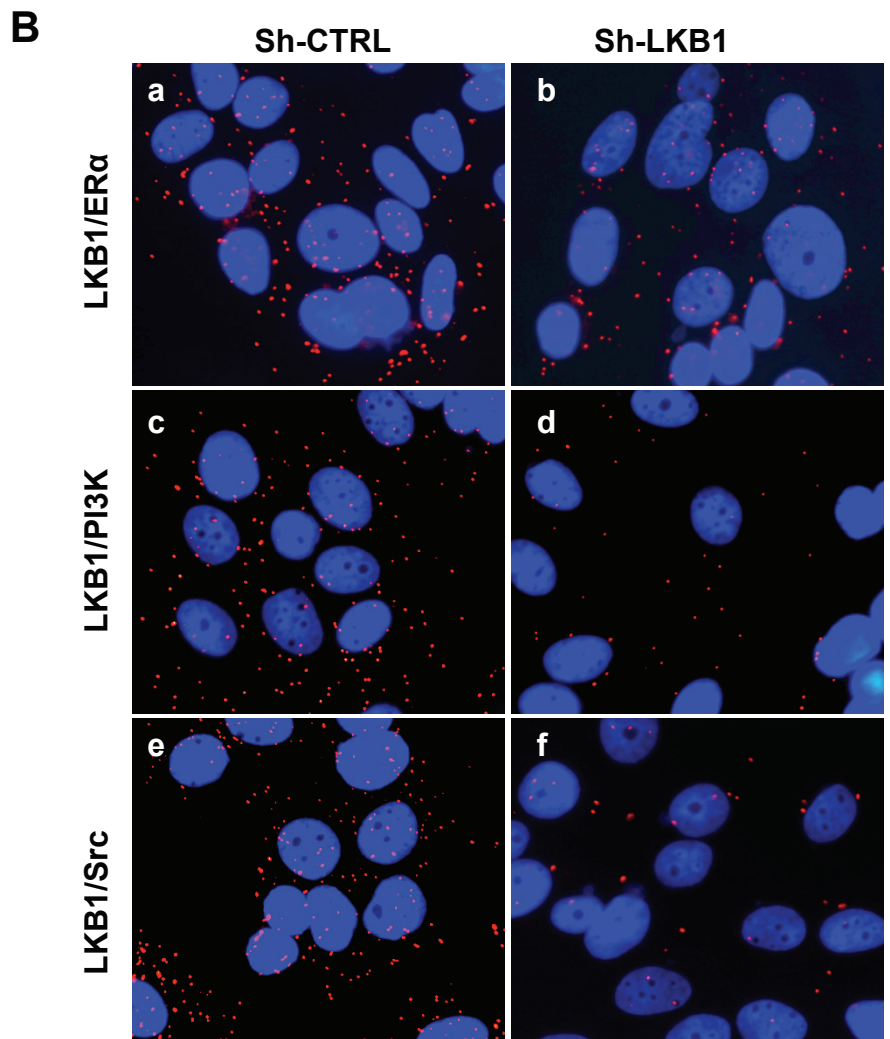
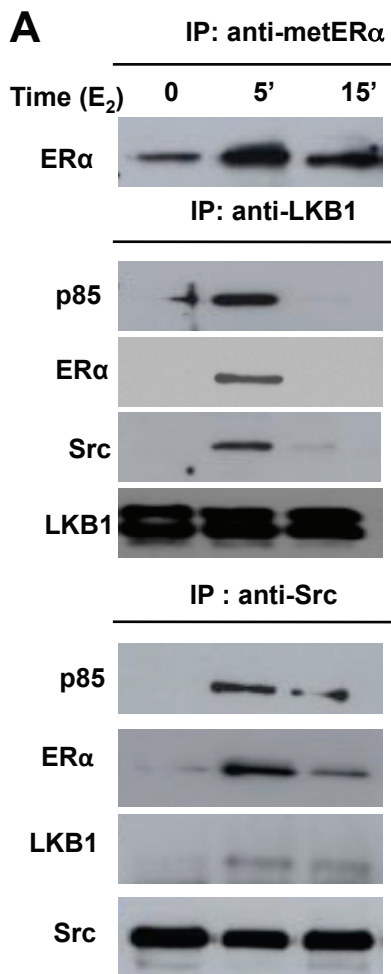
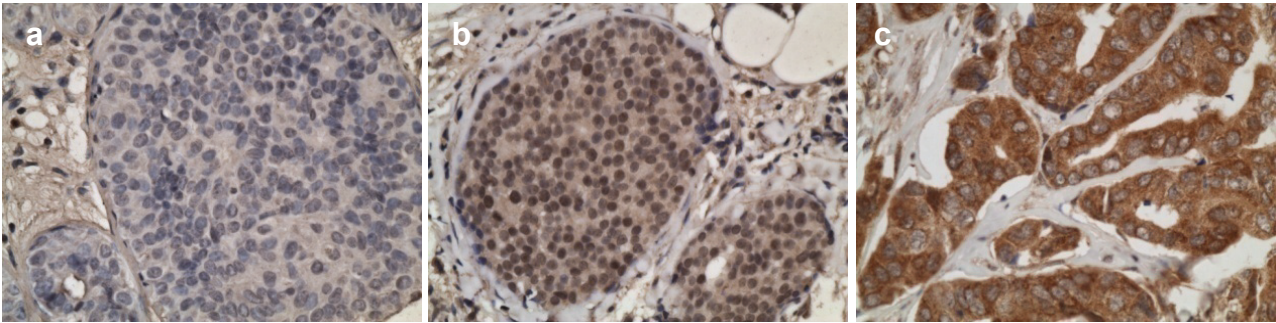


Figure 2

A



B

| | LKB1 : Nuclear staining | | | | Test |
|-----------------------------|-------------------------|------|-----------------------|------|-------------------------|
| | Intensity = 0 N=102 | | Intensity = 1 N=52 | | |
| LKB1 : Cytoplasmic staining | N | % | N | % | Chi-2 <i>p=0.066</i> |
| Intensity : 0-1 | 57 | 55.9 | 37 | 71.2 | |
| Intensity : 2-3 | 45 | 44.1 | 15 | 28.8 | |

C

| | LKB1 : Cytoplasmic staining | | | | T-Test |
|------------|-----------------------------|--------|-----------------------|--------|----------------|
| | Intensity 0-1 N=94 | | Intensity 2-3 N=79 | | |
| | mean | (std) | mean | (std) | |
| ERα/Src | 4.98 | (2.76) | 6.29 | (4.10) | <i>p=0.028</i> |
| ERα/PI3K | 5.89 | (3.45) | 7.09 | (4.52) | <i>p=0.081</i> |
| ERα/metERα | 4.14 | (2.53) | 5.07 | (3.61) | <i>p=0.079</i> |

D

| | LKB1 : Nuclear staining | | | | T-Test |
|------------|-------------------------|--------|---------------------|--------|----------------|
| | Intensity 0 N=102 | | Intensity 1 N=52 | | |
| | mean | (std) | mean | (std) | |
| ERα/Src | 5.79 | (3.64) | 5.02 | (2.99) | <i>p=0.208</i> |
| ERα/PI3K | 6.90 | (4.38) | 5.47 | (2.89) | <i>p=0.043</i> |
| ERα/metERα | 4.83 | (3.24) | 3.98 | (2.62) | <i>p=0.120</i> |

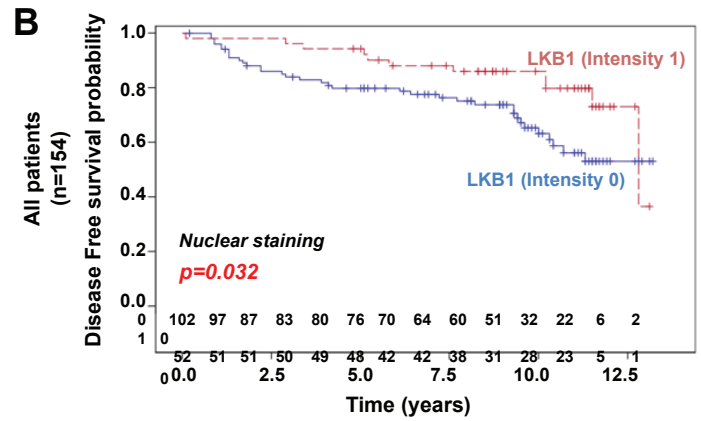
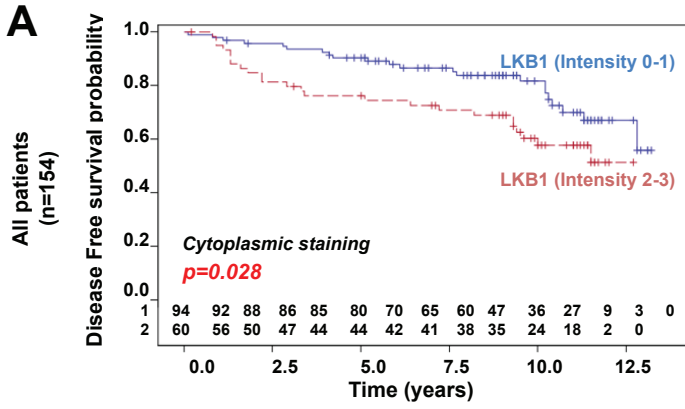
Figure 3

| | LKB1 : Cytoplasmic staining | | | | Test (p) |
|----------------------------------------|-----------------------------|------|-------------------------|------|------------------|
| | Intensity : 0-1 N=94 | | Intensity : 2-3 N=60 | | |
| | N | % | N | % | |
| Age at diagnosis (years) | | | | | p = 0.707 |
| Mean (Std) | 56.48 (12.42) | | 57.26 (12.57) | | |
| [Min-Max] | [27.30-87.40] | | [35.60-80.20] | | |
| Menopause | | | | | p = 0.765 |
| <i>missing data</i> | 0 | | 2 | | |
| No | 35 | 37.2 | 23 | 39.7 | |
| Yes | 59 | 62.8 | 35 | 60.3 | |
| Tumor size (mm) | | | | | p = 0.754 |
| < 30 mm | 68 | 72.3 | 42 | 70.0 | |
| >= 30 mm | 26 | 27.7 | 18 | 30.0 | |
| Histological grade (SBR) | | | | | p = 0.024 |
| 1 | 25 | 26.6 | 6 | 10.0 | |
| 2 | 42 | 44.7 | 28 | 46.7 | |
| 3 | 27 | 28.7 | 26 | 43.3 | |
| Lymph node involvement | | | | | p = 0.215 |
| No | 44 | 46.8 | 22 | 36.7 | |
| Yes | 50 | 53.2 | 38 | 63.3 | |
| Estrogen receptor : % marked cells | | | | | p = 0.010 |
| <i>missing data</i> | 1 | | 0 | | |
| < 10% | 6 | 6.5 | 13 | 21.7 | |
| >= 10% | 87 | 93.5 | 47 | 78.3 | |
| Progesterone receptor : % marked cells | | | | | p = 0.421 |
| <i>missing data</i> | 1 | | 0 | | |
| < 10% | 21 | 22.6 | 17 | 28.3 | |
| >= 10% | 72 | 77.4 | 43 | 71.7 | |
| HER2 status | | | | | p = 0.413 |
| <i>missing data</i> | 1 | | 1 | | |
| 0/+ / ++FISH- | 83 | 89.2 | 50 | 84.7 | |
| ++FISH+ / +++ | 10 | 10.8 | 9 | 15.3 | |
| Luminal A | | | | | p = 0.031 |
| <i>missing data</i> | 2 | | 1 | | |
| No | 32 | 34.8 | 31 | 52.5 | |
| Yes | 60 | 65.2 | 28 | 47.5 | |

Table 1

| | LKB1 : Nuclear staining | | | | Test (p) |
|----------------------------------------|-------------------------|------|-----------------------|------|------------------|
| | Intensity : 0 N=102 | | Intensity : 1 N=52 | | |
| | N | % | N | % | |
| Age at diagnosis (years) | | | | | p = 0.564 |
| Mean (Std) | 57.20 (13.32) | | 55.97 (10.59) | | |
| [Min-Max] | [27.30-87.40] | | [38.90-82.30] | | |
| Menopause | | | | | p = 0.871 |
| <i>missing data</i> | 1 | | 1 | | |
| No | 39 | 38.6 | 19 | 37.3 | |
| Yes | 62 | 61.4 | 32 | 62.7 | |
| Tumor size (mm) | | | | | p = 0.067 |
| < 30 mm | 68 | 66.7 | 42 | 80.8 | |
| >= 30 mm | 34 | 33.3 | 10 | 19.2 | |
| Histological grade (SBR) | | | | | p = 0.372 |
| 1 | 19 | 18.6 | 12 | 23.1 | |
| 2 | 44 | 43.1 | 26 | 50.0 | |
| 3 | 39 | 38.2 | 14 | 26.9 | |
| Lymph node involvement | | | | | p = 0.105 |
| No | 39 | 38.2 | 27 | 51.9 | |
| Yes | 63 | 61.8 | 25 | 48.1 | |
| Estrogen receptor : % marked cells | | | | | p = 0.004 |
| <i>missing data</i> | 0 | | 1 | | |
| < 10% | 18 | 17.6 | 1 | 2.0 | |
| >= 10% | 84 | 82.4 | 50 | 98.0 | |
| Progesterone receptor : % marked cells | | | | | p = 0.064 |
| <i>missing data</i> | 0 | | 1 | | |
| < 10% | 30 | 29.4 | 8 | 15.7 | |
| >= 10% | 72 | 70.6 | 43 | 84.3 | |
| HER2 status | | | | | p = 0.301 |
| <i>missing data</i> | 2 | | 0 | | |
| 0/+/>++FISH- | 85 | 85.0 | 48 | 92.3 | |
| ++FISH+/>+++ | 15 | 15.0 | 4 | 7.7 | |
| Luminal A | | | | | p = 0.135 |
| <i>missing data</i> | 2 | | 1 | | |
| No | 46 | 46.0 | 17 | 33.3 | |
| Yes | 54 | 54.0 | 34 | 66.7 | |

Table 2



C

| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-----------------------------|---------------|--------|-------------|
| LKB1 : Cytoplasmic staining | Intensity 0-1 | 1 | [-.] |
| | Intensity 2-3 | 1.82 | [1.01-3.30] |
| Tumor size (mm) | <30mm | 1 | [-.] |
| | >=30mm | 3.35 | [1.84-6.08] |
| Histological grade (SBR) | Grade 1 | 1 | [-.] |
| | Grade 2 | 1.38 | [0.54-3.55] |
| | Grade 3 | 3.05 | [1.20-7.79] |

D

| | P-4E-BP1 | | T-Test |
|----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| | Intensity 1 N=77 | Intensity 2-3 N=54 | |
| LKB1: cytoplasmic staining | | | Chi2 p=0.004 |
| ND | 6 | 3 | |
| Intensity 0-1 | 48 (67.6%) | 21 (41.2%) | |
| Intensity 2-3 | 23 (32.4 %) | 30 (58.8%) | |

Figure 4

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: LKB1 interacts with metER α

(a) GST pull-down assay of ER α with LKB1. GST and GST-LKB1 fusion proteins were incubated with *in vitro*-translated ^{35}S -labeled ER α (*) with or without E $_2$ (10 $^{-6}$ M). Translated luciferase* serves as a negative control.

(b) E $_2$ induces ER α /LKB1 interaction in MCF-7. Immunoprecipitation of LKB1 from extracts of MCF-7 was performed followed by western blotting with antibody against ER α and LKB1. On the same extract metER α was analyzed by immunoprecipitation with the anti-metER α revealed with an anti-ER α .

(c) PRMT1 is essential to ER α /LKB1 interaction. Lysates of MCF-7 cells transfected with control siRNAs or with specific PRMT1 siRNAs were treated with E $_2$ (10 $^{-8}$ M), analyzed for ER α methylation and LKB1/ER α interaction.

(d) LKB1 interacts only with metER α . Cell extracts were analyzed for LKB1/ER α interaction. In parallel, cell extracts were immunoprecipitated with metER α antibody. Unbound fractions were then used for a second immunoprecipitation using anti-LKB1 antibody followed by western blotting with anti-ER α and anti-LKB1 antibodies.

Figure 2: LKB1 is a member of the complex containing metER α /Src/PI3K

(a) MCF-7 were treated with E $_2$ (10 $^{-8}$ M) and analyzed for ER α methylation. The same extracts were immunoprecipitated with an anti-LKB1 antibody and the immunoprecipitates were blotted with the indicated antibodies. A similar experiment was performed with anti-Src antibody followed by western blot with the indicated antibodies (lower panel).

(b) Detection of endogenous interaction between LKB1 with ER α /PI3K/Src by PLA. MCF-7 were incubated with E $_2$ 10 $^{-8}$ M for 5 min. *In situ* PLA for LKB1/ER α (panel a,b), LKB1/PI3K (panel c,d) and LKB1/Src (panel e,f) dimers was performed with ER α -, Src-, PI3K, and LKB1-specific antibodies. The detected dimers are represented by red dots. The same experiments were performed in MCF-7 stably transfected with ShLKB1 (panels b;d;f). The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X63).

(c) Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Methods section. The mean +/- s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's t-test. *p<0.05 indicates statistically significant differences.

(d) GST pull-down assay of LKB1 with Src and PI3K. GST pull down assay of *in vitro* translated ^{35}S -labeled LKB1 (*) was incubated with GST, GST-Src and GST-p85 and the bound proteins were visualized by autoradiography.

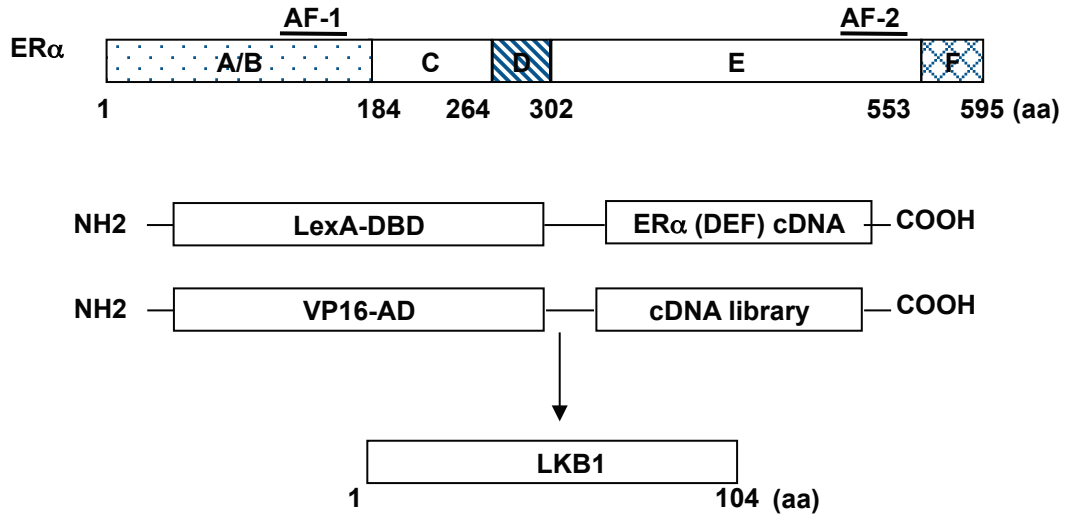
Figure 3: Expression of LKB1 in breast tumours

(a) LKB1 expression was analyzed by IHC on formalin-fixed human tumours. Representative images of different IHC staining profiles are shown (panel a: no staining, panel b: intermediate staining, panel c: strong staining) (Obj x 40). (b). Correlation analysis between cytoplasmic and nuclear intensity staining of LKB1 in 154 tumour samples. (c) Correlation studies between LKB1 cytoplasmic expression and ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /metER α expression were performed using the Student T-test. Significant correlations at 10% level are highlighted in bold characters. (d) Correlation studies between LKB1 nuclear expression and ER α /Src, ER α /PI3K and ER α /metER α expression were performed as above.

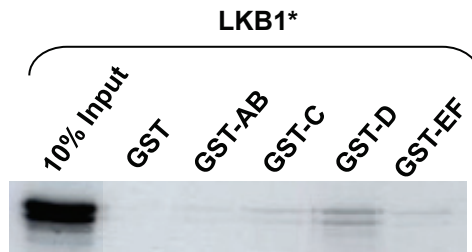
Figure 4: LKB1, a marker of prognosis in breast cancer

(a) Kaplan Meier estimates of DFS according to LKB1 cytoplasmic expression groups. (b). Kaplan Meier estimates of DFS according to LKB1 nuclear expression groups. (c) Final multivariate Cox modelisation of DFS adjusted on LKB1 cytoplasmic expression. Hazard ratio for high LKB1 expression (intensity: 2-3) relative to low LKB1 expression (intensity: 0-1) is presented, adjusted on tumour size and histological grade. (d) Correlation studies between P-4E-BP1 and LKB1 cytoplasmic expression were performed using the χ^2 test. Significant correlations at 5% level are highlighted in bold characters.

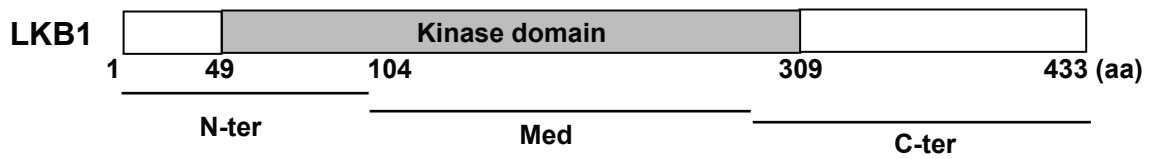
a



b



c



d

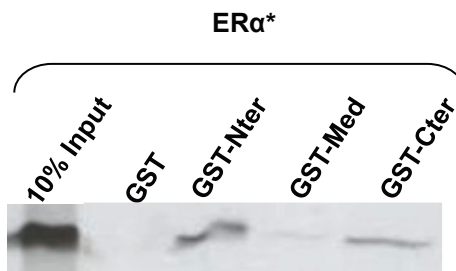
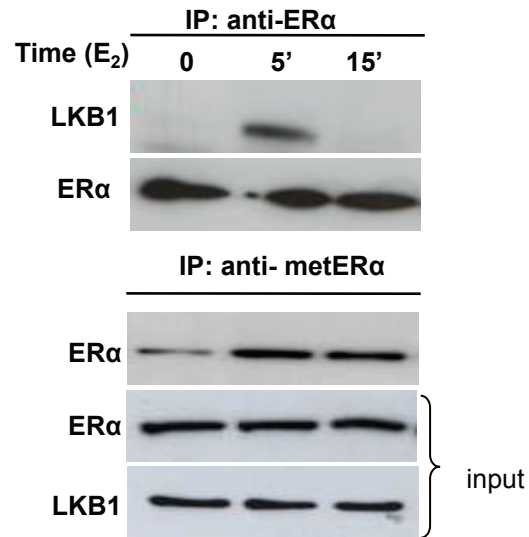
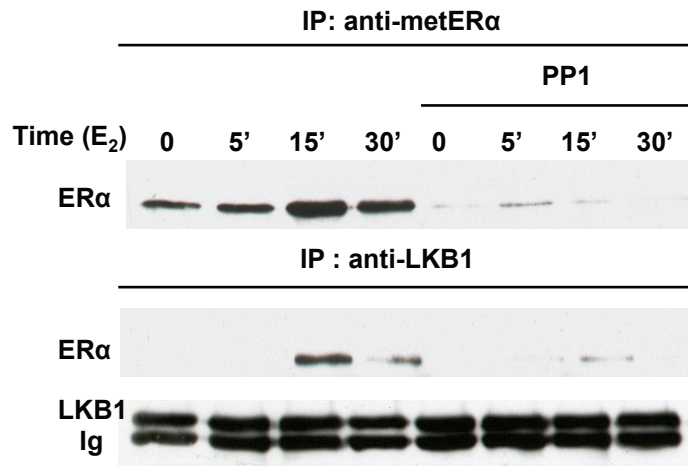


Figure S1

a



b



c

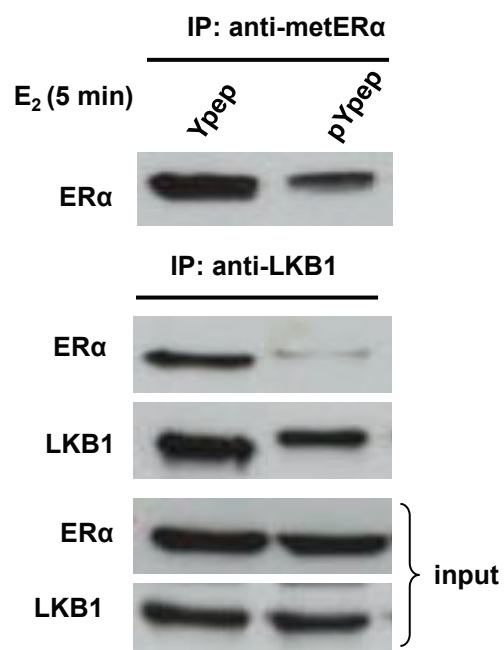
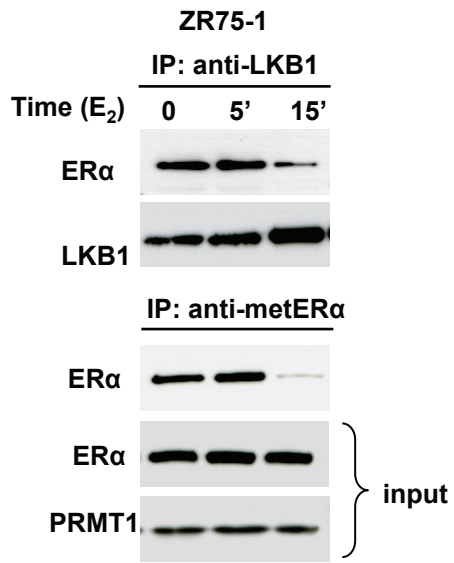
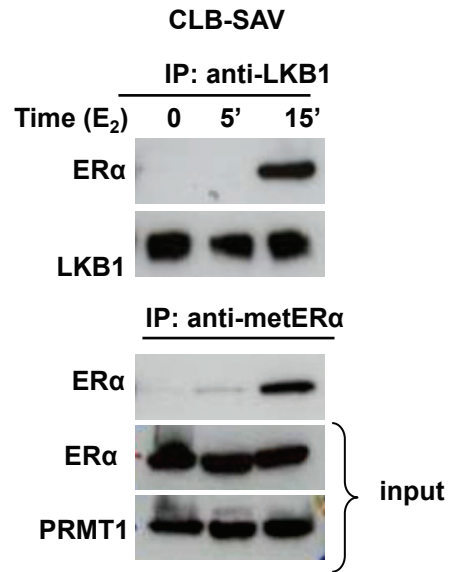


Figure S2

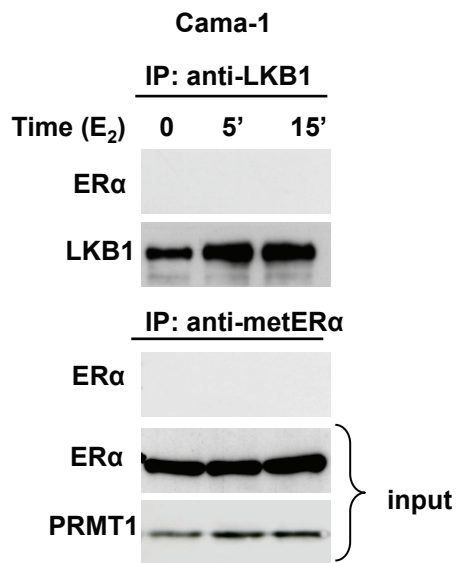
a



b



c



d

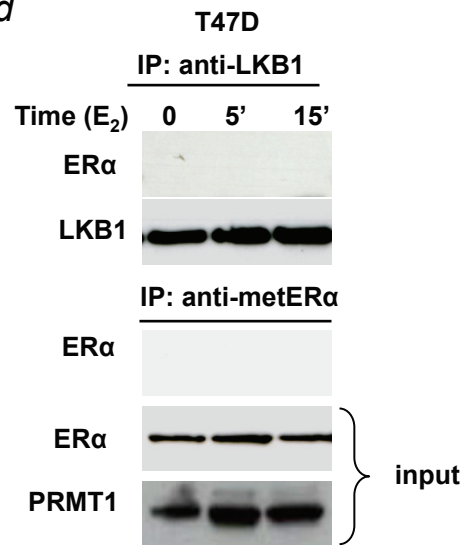


Figure S3

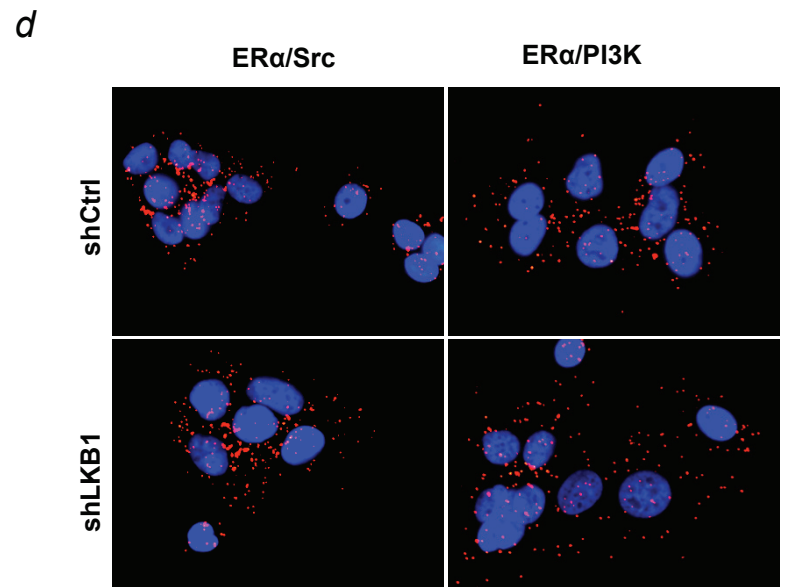
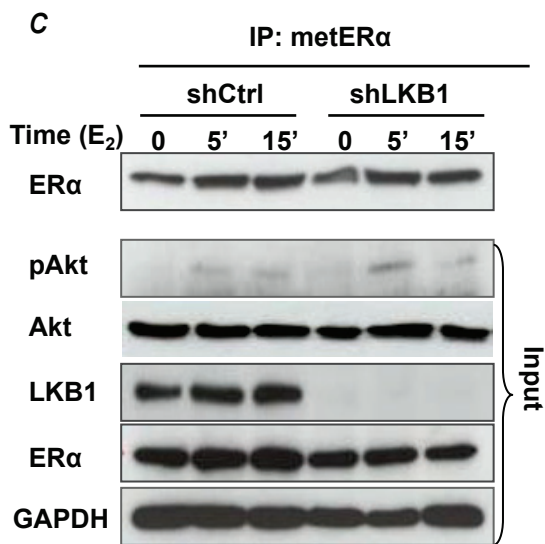
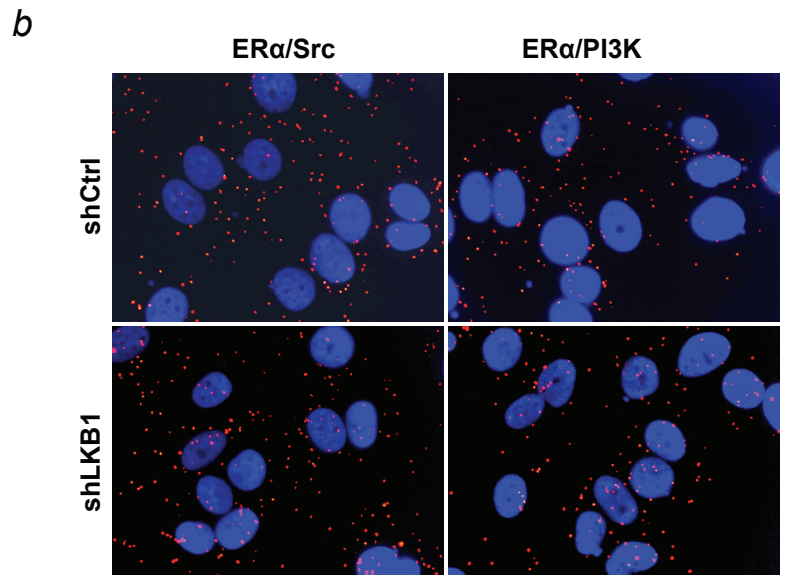
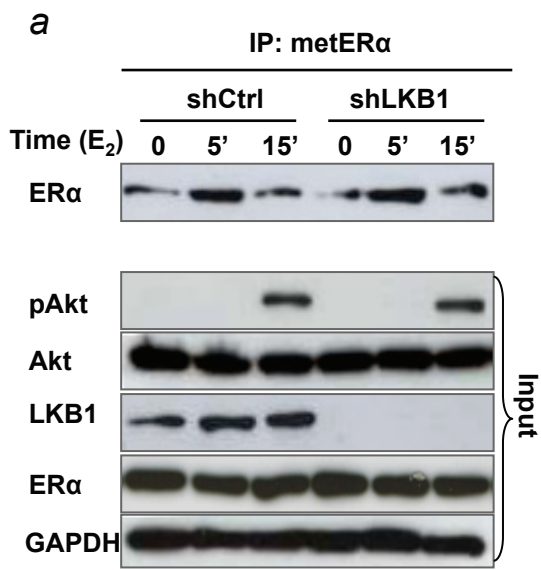
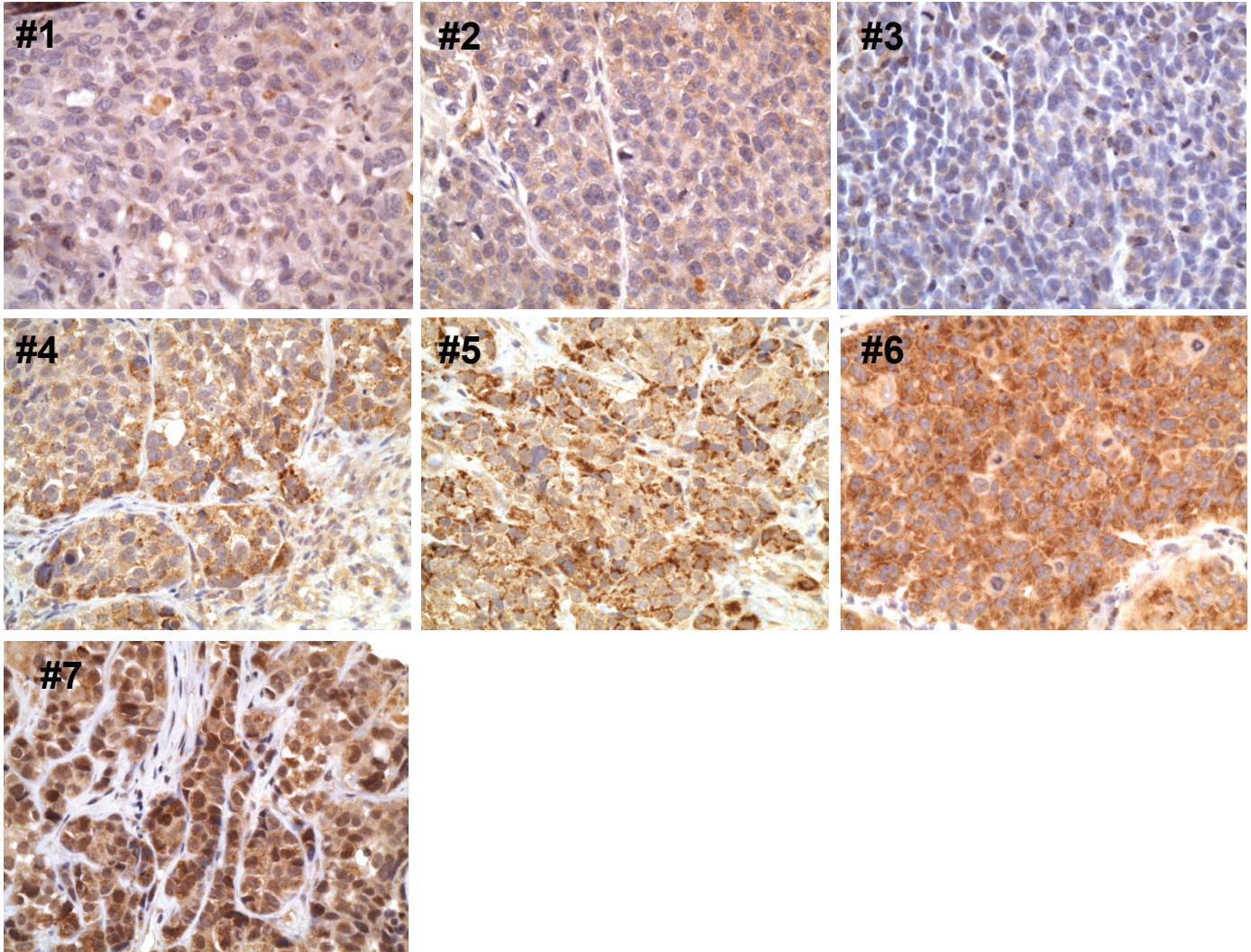


Figure S4

a



b

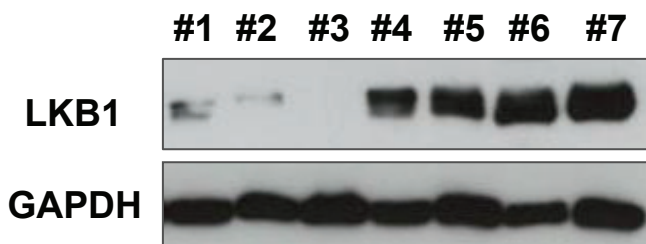


Figure S5

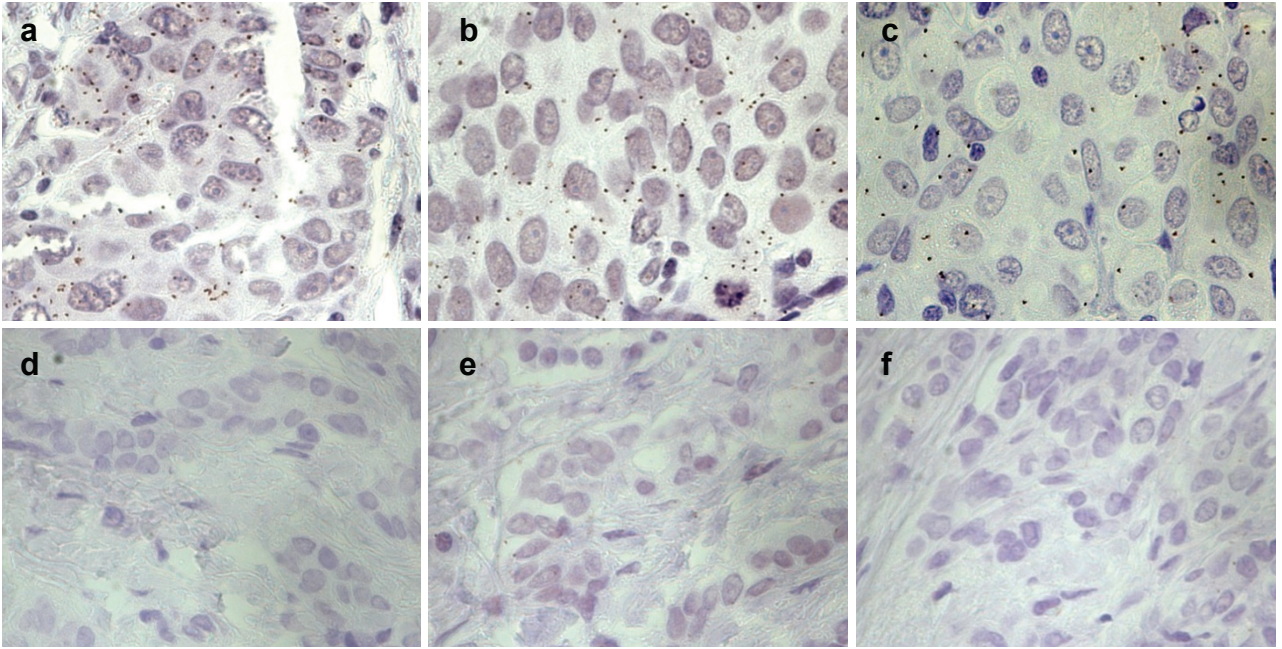
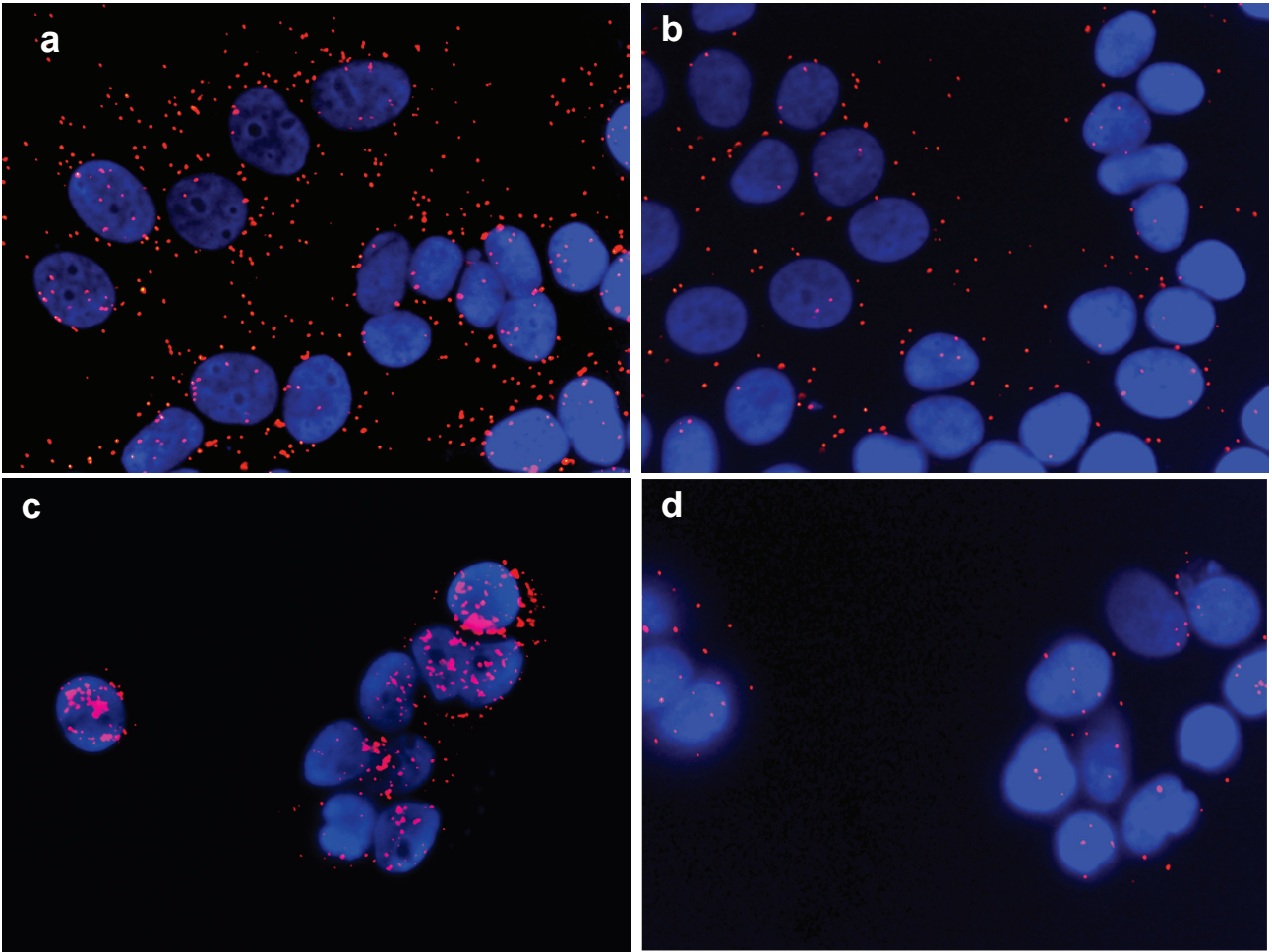
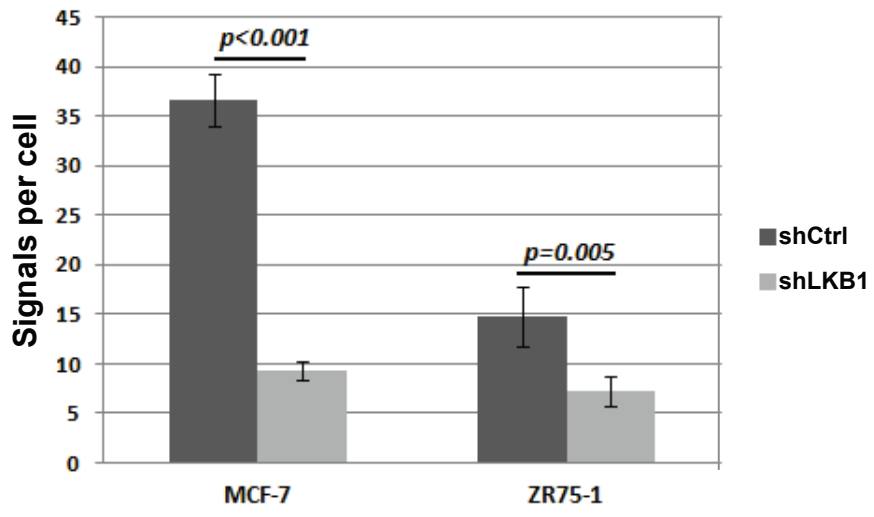


Figure S6

a



b



c

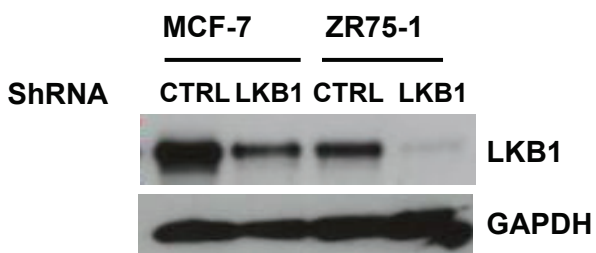
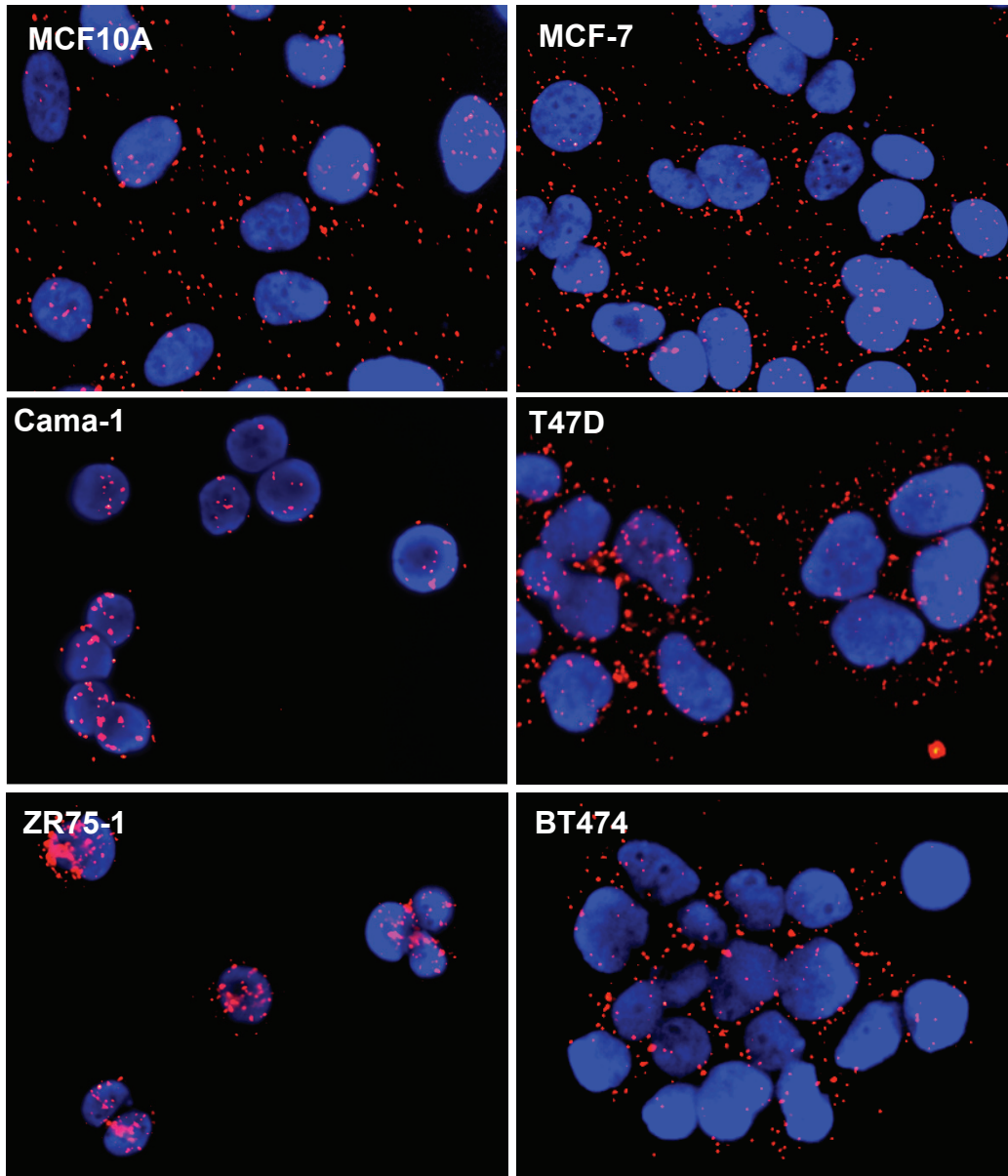


Figure S7

a



b

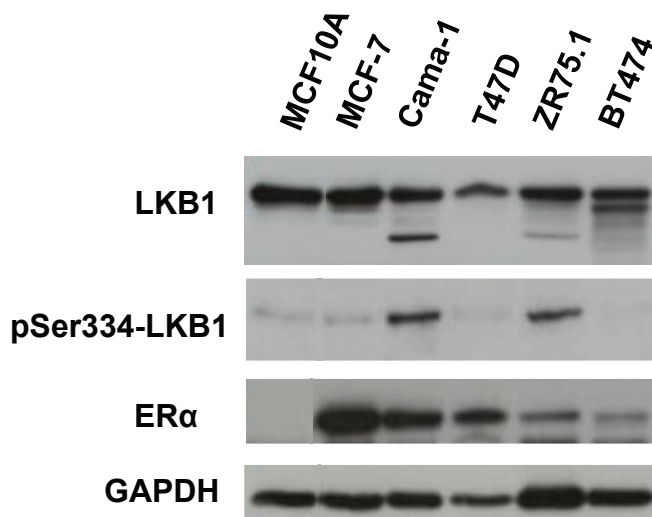
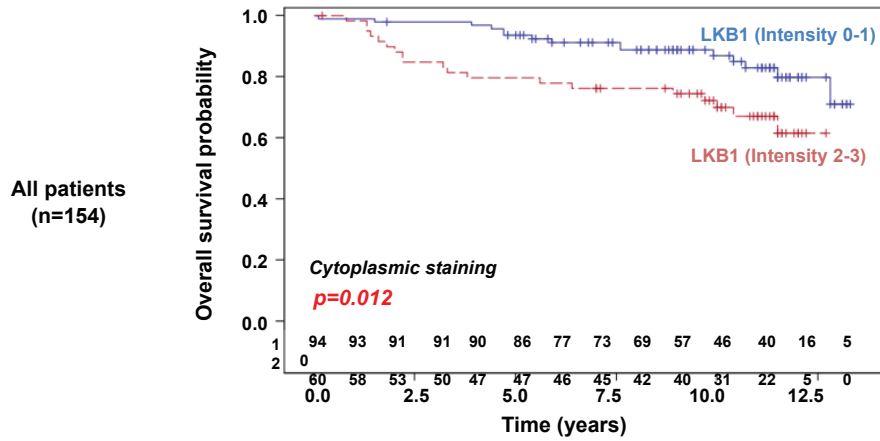
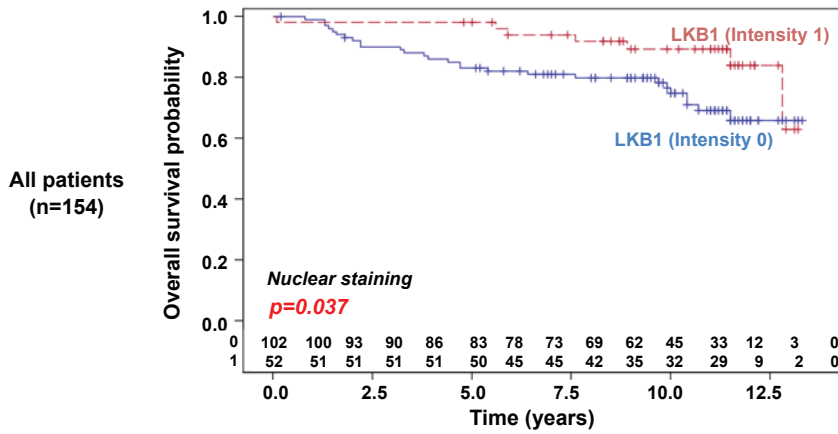


Figure S8

a



b

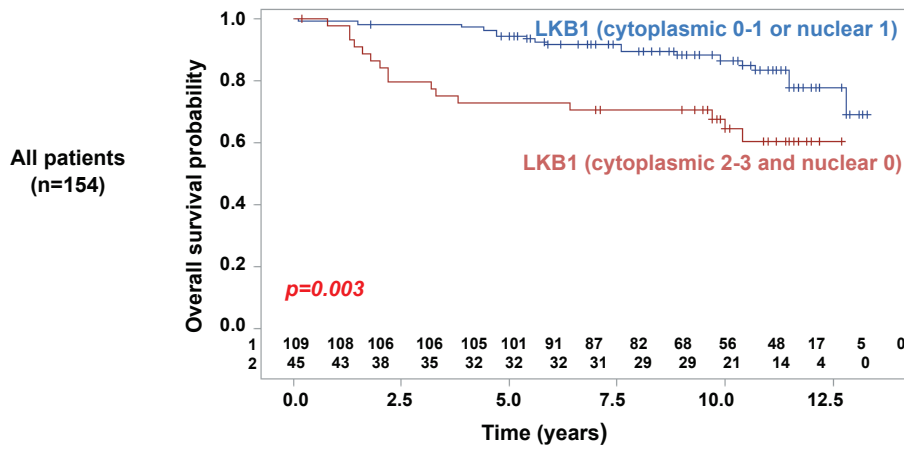


C

| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-----------------------------|------|-------------|-------------------|
| LKB1 : Cytoplasmic staining | | | |
| Intensity 0-1 | 1 | [.-.] | 0.012 |
| Intensity 2-3 | 2.48 | [1.22-5.03] | |
| Age at diagnosis (years) | | | 0.002 |
| For 1 additional year | 1.05 | [1.02-1.08] | |
| Tumor size (mm) | | | <0.0001 |
| <30mm | 1 | [.-.] | |
| ≥30mm | 4.48 | [2.24-8.98] | |
| Histological grade (SBR) | | | 0.021 |
| Grade 1 | 1 | [.-.] | |
| Grade 2 | 0.94 | [0.28-3.17] | |
| Grade 3 | 2.54 | [0.78-8.24] | |

Figure S9

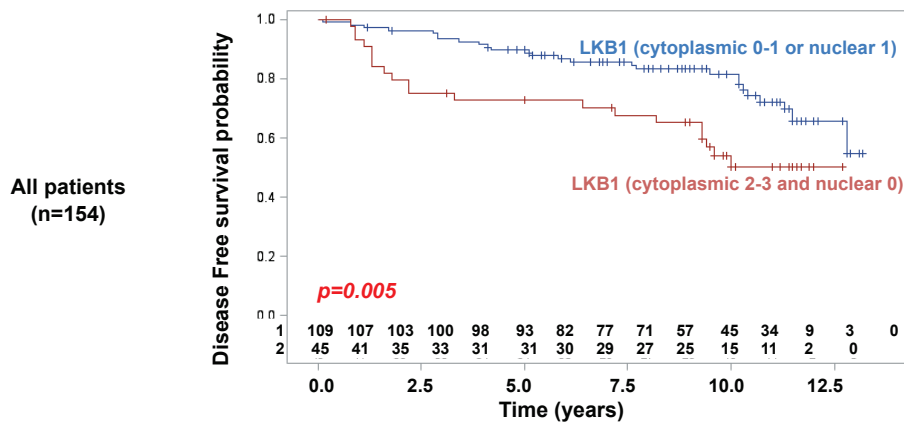
a



b

| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-------------------------------------------------------|------|--------------|-------------------|
| LKB1 : Combinaison of LKB1 staining | | | |
| Intensity 0-1 (cytoplasmic) or intensity 1 (nuclear) | 1 | [.-.] | 0.005 |
| Intensity 2-3 (cytoplasmic) and intensity 0 (nuclear) | 2.74 | [1.35-5.56] | |
| Age at diagnosis (years) | | | 0.012 |
| For 1 additional year | 1.04 | [1.01-1.07] | |
| Tumor size (mm) | | | <0.0001 |
| <30mm | 1 | [.-.] | |
| >=30mm | 4.92 | [2.40-10.06] | |
| Histological grade (SBR) | | | 0.014 |
| Grade 1 | 1 | [.-.] | |
| Grade 2 | 1.10 | [0.33-3.70] | |
| Grade 3 | 3.06 | [0.93-10.02] | |

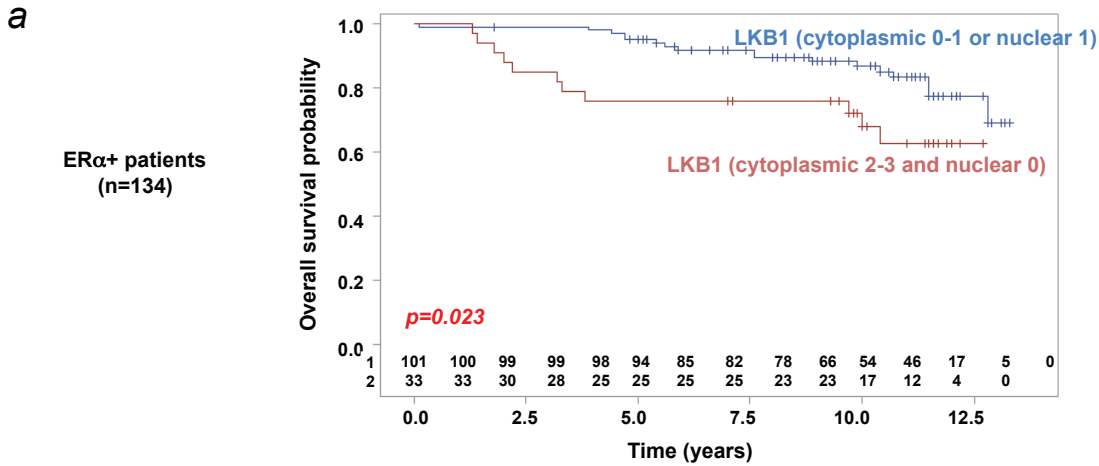
c



d

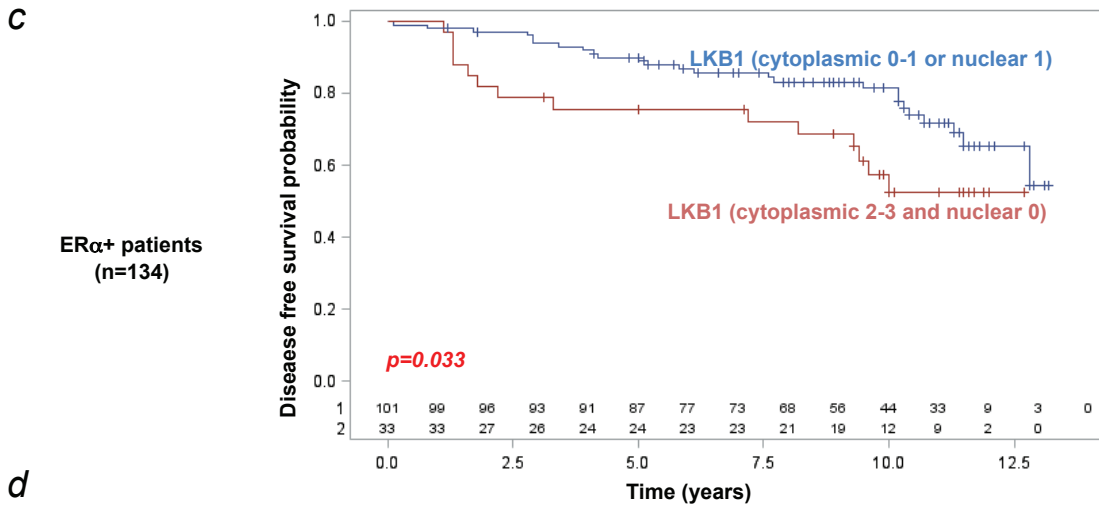
| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-------------------------------------------------------|------|-------------|-------------------|
| LKB1 : Combinaison of LKB1 staining | | | |
| Intensity 0-1 (cytoplasmic) or intensity 1 (nuclear) | 1 | [.-.] | 0.006 |
| Intensity 2-3 (cytoplasmic) and intensity 0 (nuclear) | 2.31 | [1.27-4.19] | |
| Tumor size (mm) | | | <0.0001 |
| <30mm | 1 | [.-.] | |
| >=30mm | 3.64 | [1.97-6.72] | |
| Histological grade (SBR) | | | 0.008 |
| Grade 1 | 1 | [.-.] | |
| Grade 2 | 1.46 | [0.57-3.74] | |
| Grade 3 | 3.34 | [1.30-8.55] | |

Figure S10



b

| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-------------------------------------------------------|------|-------------|--------------|
| LKB1 : Combinaison of LKB1 staining | | | |
| Intensity 0-1 (cytoplasmic) or intensity 1 (nuclear) | 1 | [.-.] | 0.015 |
| Intensity 2-3 (cytoplasmic) and intensity 0 (nuclear) | 2.63 | [1.20-5.75] | |
| Age at diagnosis (years) | | | 0.009 |
| For 1 additional year | 1.05 | [1.01-1.08] | |
| Tumor size (mm) | | | 0.002 |
| <30mm | 1 | [.-.] | |
| \geq 30mm | 3.53 | [1.62-7.68] | |
| Histological grade (SBR) | | | 0.021 |
| Grade 1 | 1 | [.-.] | |
| Grade 2 | 0.96 | [0.28-3.26] | |
| Grade 3 | 2.89 | [0.85-9.77] | |



d

| Variable | HR | CI 95% | p-value |
|-------------------------------------------------------|------|--------------|---------------|
| LKB1 : Combinaison of LKB1 staining | | | |
| Intensity 0-1 (cytoplasmic) or intensity 1 (nuclear) | 1 | [.-.] | 0.012 |
| Intensity 2-3 (cytoplasmic) and intensity 0 (nuclear) | 2.72 | [1.24-5.97] | |
| Tumor size (mm) | | | 0.0001 |
| <30mm | 1 | [.-.] | |
| \geq 30mm | 4.70 | [2.15-10.27] | |
| Histological grade (SBR) | | | 0.008 |
| Grade 1 | 1 | [.-.] | |
| Grade 2 | 1.59 | [0.49-5.16] | |
| Grade 3 | 4.62 | [1.42-15.04] | |

Figure S11

| | All N=154 | |
|----------------------------------------|---------------|------|
| | N | % |
| Age at diagnosis (years) | | |
| Mean (Std) | 56.79 (12.44) | |
| [Min-Max] | [27.30-87.40] | |
| Menopause | | |
| <i>missing data</i> | 2 | |
| No | 58 | 38.2 |
| Yes | 94 | 61.8 |
| Tumor size (mm) | | |
| < 30 mm | 110 | 71.4 |
| >= 30 mm | 44 | 28.6 |
| Histological grade (SBR) | | |
| 1 | 31 | 20.1 |
| 2 | 70 | 45.5 |
| 3 | 53 | 34.4 |
| Lymph node involvement | | |
| No | 66 | 42.9 |
| Yes | 88 | 57.1 |
| Estrogen receptor : % marked cells | | |
| <i>missing data</i> | 1 | |
| < 10% | 19 | 12.4 |
| >= 10% | 134 | 87.6 |
| Progesterone receptor : % marked cells | | |
| <i>missing data</i> | 1 | |
| < 10% | 38 | 24.8 |
| >= 10% | 115 | 75.2 |
| HER2 status | | |
| <i>missing data</i> | 2 | |
| 0/+ / ++FISH- | 133 | 87.5 |
| ++FISH+ / +++ | 19 | 12.5 |
| Luminale A | | |
| <i>missing data</i> | 3 | |
| No | 63 | 41.7 |
| Yes | 88 | 58.3 |

Table S1

| Intensity | All N=154 | |
|------------------------------------|--------------|------|
| | N | % |
| LKB1 : Cytoplasmic staining | | |
| 0 | 24 | 15.6 |
| 1 | 70 | 45.5 |
| 2 | 56 | 36.4 |
| 3 | 4 | 2.6 |
| LKB1 : Nuclear staining | | |
| 0 | 102 | 66.2 |
| 1 | 52 | 33.8 |

Table S2

SUPPLEMENTAL DATA

LKB1, a two-faced Janus marker of breast cancer

Katia Bouchekioua-Bouzaghrou, Coralie Poulard, Juliette Rambaud, Emilie Lavergne, Nader Hussein, Marc Billaud, Thomas Bachelot, Sylvie Chabaud, Sylvie Mader, Guila Dayan, Isabelle Treilleux, Laura Corbo and Muriel Le Romancer

Supplemental Results

Figure S1: Identification of domains of interaction between ER α and LKB1.

(a) The organization of ER α protein showing the functional domains and the screen strategy. ER α displays conserved functional domains. A/B including AF-1 (Activation Function 1), C containing the DBD (DNA binding domain), D called Hinge domain including nuclear localization signals, E containing the LBD (Ligand binding domain), AF-2 (Activation Function 2) and F allowing agonist/antagonist regulation. The bait used for the two hybrid screen was DEF of ER α fused to LexA-DBD and cDNA from library were fused to VP16 activation domain. The first 104 aa of LKB1 were identified as a prey.

(b) Radioactive LKB1 (*) was incubated with GST and with the different domains of ER α coupled with GST, and the bound proteins were visualized by autoradiography.

(c) The domains of LKB1 are presented.

(d) Radioactive ER α (*) was incubated with GST and several domains of LKB1 coupled with GST, and the bound proteins were visualized by autoradiography.

Figure S2: LKB1/ER α interaction in a cellular context.

(a) Immunoprecipitation of ER α from extracts of MCF-7 was performed followed by western blotting with antibody against ER α and LKB1. On the same extract metER α was analyzed by immunoprecipitation with the anti-metER α revealed with an anti-ER α .

(b) MCF-7 were treated or not with PP1 (5 μ M) 15 min before E₂ treatment. ER α methylation and LKB1/ER α interaction were analyzed.

(c) MCF-7 cells were incubated with 1nM of a peptide mimicking hER α 536-541 containing Y537 (Y-pep) or the corresponding phosphorylated peptide (pY-pep) 30 min before E₂ treatment. Then, cell lysates were analyzed for ER α methylation and LKB1/ER α interaction.

Figure S3: LKB1/ER α interaction in human breast cancer cells.

(a) ZR75-1, (b) CLB-SAV*, (c) Cama-1 and (d) T47D cells were analyzed for ER α methylation and LKB1/ER α interaction.

*CLB-SAV is an epithelial cell line established by C. Caux (Centre Leon Berard, Lyon, France) from ascitic fluid of a 58-year old patient with lobular breast carcinoma. We have previously shown that they express metER α (Le Romancer M. et al. 2008).

Figure S4: LKB1 is not essential for E₂ non genomic signalling

(a) Lysates of MCF-7 cells stably transfected with control shRNAs or with specific LKB1 shRNAs were treated with E₂ for the indicated times and were analyzed for ER α methylation as described in Figure S3. Akt activation was determined by performing western blotting with an antibody specific for P-Akt (Ser473).

(b) MCF-7 cells (controls or shLKB1) were incubated with E₂ 10⁻⁸M for 5 min, then the complex formation was analysed by PLA studying ER α /Src and ER α /PI3K interaction.

(c) ER α methylation was assessed in lysates of ZR75.1 cells stably transfected with control shRNAs or with specific LKB1 shRNAs as described in A. Akt phosphorylation from ZR75.1 lysates was analyzed as in A.

(d) ZR75.1 cells (controls of ShLKB1) were incubated with E₂ 10⁻⁸M for 5 min, then the complex formation was analysed by PLA studying ER α /Src and ER α /PI3K interaction.

Figure S5: LKB1 expression in BC samples.

(a) LKB1 expression was analyzed by IHC on formalin-fixed human tumours. Representative images of different IHC staining profiles are shown (tumours #1, #2, #3: faint staining, tumours #4, #5: intermediate staining, tumours #6, #7: strong staining) (Obj x 40).

(b) LKB1 expression has also been analyzed by western blotting. The loading quality was determined by GAPDH expression.

Figure S6: Interaction of LKB1 with ER α /Src/PI3K in breast tumor samples.

LKB1/ER α (panels a,d), LKB1/Src (panels b,e) and LKB1/PI3K (panels c,f) expression were detected by PLA on 2 formalin-fixed paraffin-embedded breast tumours. The experiments were performed in three serial sections from the same tumour (Obj X40).

Figure S7: LKB1 localization in MCF-7 and ZR75-1 cells.

(a) LKB1 localization was studied by *in situ* PLA detection in control MCF-7 cells (panel a) and in LKB1 knock downed cells (panel b), and in control ZR75-1 cells (panel c) and LKB1 knock downed cells (panel d).

(b) Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Materials and methods. The mean +/- s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's test.

(c) Expression of LKB1 in MCF-7 and ZR75-1 cells. LKB1 and GAPDH expression were studied by western blotting in control cells and in cells knock downed for LKB1.

Figure S8: LKB1 localization and phosphorylation in human breast cell lines

(a) LKB1 localization was studied by *in situ* PLA detection in several human breast cell lines.

(b) Cell lysates from the correspondent cell lines have been analyzed for LKB1 expression and phosphorylation on Ser334 using a specific antibody (Abnova). ER α and GAPDH expression were also analyzed as controls.

Figure S9: OS analysis: Kaplan Meier estimates according to LKB1 expression groups and Cox modelisation.

(a) Patient's outcome was compared between LKB1 cytoplasmic expression groups (staining intensity 0-1 versus 2-3), using the Log-Rank test.

(b) Patient's outcome was compared between LKB1 nuclear expression groups (staining intensity 0 versus 1), using the Log-Rank test.

(c) Final multivariate modelisation of OS integrating LKB1 cytoplasmic expression. Hazard ratio for high LKB1 cytoplasmic expression (intensity: 2-3) relative to low LKB1 expression (intensity: 0-1) is presented adjusted on age at diagnosis, tumor size and histological grade.

Figure S10: OS and DFS analysis: Kaplan Meier estimates according to combination of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression and Cox modelisation.

(a) Patient's outcome was compared between LKB1 intensity groups, determined by the combination of cytoplasmic and nuclear expression (high cytoplasmic expression and no nuclear expression, versus low cytoplasmic expression or nuclear expression), using the Log-Rank test.

(b) Final multivariate modelisation of OS, integrating combination of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression. Hazard ratios for high LKB1 cytoplasmic expression (intensity: 2-3) and no nuclear expression (intensity 0), relative to low LKB1 cytoplasmic expression (intensity: 0-1) or nuclear expression (intensity 1) are presented, adjusted on age at diagnosis, tumor size and histological grade.

(c) Kaplan Meier estimates of DFS by combination of cytoplasmic and nuclear expression groups. The blue curve concerns patients with low LKB1 cytoplasmic expression (intensity 0, 1) or nuclear expression (intensity 1) whereas the red curve presents high LKB1 cytoplasmic expression (intensity 2, 3) and no nuclear expression (intensity 0).

(d) Final multivariate Cox modelisation of DFS integrating combination of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression as described in A).

Figure S11: OS and DFS analysis on ER α -positive tumours: Kaplan Meier estimates according to LKB1 combination of LKB1 expression groups.

(a) Patient's outcome was compared between LKB1 expression groups, integrating simultaneously LKB1 cytoplasmic and nuclear expression (high cytoplasmic expression and no nuclear expression, versus low cytoplasmic expression or nuclear expression), using the Log-Rank test.

(b) Final multivariate modelisation of OS, integrating combination of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression is presented, adjusted on age at diagnosis, tumor size and histological grade.

(c) Patient's outcome was compared between LKB1 expression groups, integrating simultaneously LKB1 cytoplasmic and nuclear expression (high cytoplasmic expression and no

nuclear expression, versus low cytoplasmic expression or nuclear expression), using the Log-Rank test.

(d) Final multivariate modelisation of DFS, integrating combination of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression is presented adjusted on tumor size and histological grade (SBR).

Table S1. Sample description: Distribution of clinical parameters

Clinical parameters were analyzed for the 154 patients included in the TMA study.

Table S2: Distribution of LKB1 cytoplasmic and nuclear expression.

This table shows the intensities of LKB1 expression in both compartments in the 154 breast tumors.

c- Discussion

Un criblage double hybride a permis d'identifier l'interaction entre LKB1 et ER α . Après la validation de cette interaction en GST pull down, nous avons pensé que LKB1 pouvait être un nouveau corégulateur de ER α . En effet, LKB1 possède un motif LxxLL, motif signature des coactivateurs des récepteurs nucléaires, nécessaires pour l'interaction entre ER α et ses partenaires (Walker et al., 1984). Cependant, en endogène, nous n'avons pas été en mesure de mettre en évidence l'effet de LKB1 sur l'activité transcriptionnelle de ER α . Toutefois, le groupe de P. Marignani, après surexpression de LKB1 et ER α , a montré l'interaction entre LKB1 et ER α dans le noyau, ainsi que l'implication de LKB1 sur l'activité transcriptionnelle de ER α (Nath-Sain et al., 2009).

LKB1 est largement décrite pour être une protéine cytoplasmique. De ce fait, nous nous sommes demandés si LKB1 pouvait être impliquée dans les voies non génomiques dépendantes des œstrogènes. Différentes expériences nous ont permis de montrer que LKB1 peut interagir avec la forme méthylée de ER α . i) Une inhibition de PRMT1 qui méthyle spécifiquement ER α bloque la méthylation de ER α et l'interaction ER α /LKB1. ii) Une déplétion de ER α méthylé par immunoprécipitation, suivie d'une nouvelle immunoprécipitation sur ces mêmes extraits déplétés pour mER α , démontre que l'on perd l'interaction ER α /LKB1 lorsque ER α n'est pas méthylé. iii) Le traitement des cellules avec un peptide qui détruit l'interaction entre ER α et Src et la méthylation de ER α (Varricchio et al., 2007; Poulard et al., 2012), abolit aussi l'interaction entre ER α et LKB1. iv) L'interaction entre LKB1 et ER α est uniquement retrouvée dans les lignées cellulaires exprimant ER α méthylé. Une démonstration directe de l'interaction entre LKB1 et mER α aurait certainement été plus clair, cependant ces expériences par co-immunoprécipitations n'ont pas été réalisables, probablement dues à des masquages d'épitopes ou des problèmes conformationnels. L'anticorps mER α ne fonctionnant pas en Duolink dans les lignées cellulaires fixées, nous n'avons pu montrer l'interaction entre LKB1 et mER α par cette technique. Les points énoncés précédemment seuls ne pourraient pas permettre de conclure que LKB1 interagit avec mER α , puisque l'inhibition de PRMT1 pourrait par exemple inhiber l'interaction de façon indirecte, cependant l'ensemble des données convergent clairement vers cette observation. Cela suggère l'implication de LKB1 dans les voies de signalisation extra-nucléaire. Ces résultats ne sont pas forcément en désaccord avec ceux de Nath-Sain et al. qui décrivent LKB1 comme un corégulateur de ER α (Nath-Sain et al., 2009). En effet, il a déjà été décrit pour certains co-régulateurs de ER α , tels que PELP1 (aussi appelé MNAR), qu'ils peuvent intervenir dans la régulation des voies génomiques ou non génomiques (Vadlamudi et al., 2005).

Afin de déterminer si le lien entre LKB1 et les voies non génomiques existe dans un contexte tumoral, nous avons étudié l'expression de LKB1 sur la cohorte de patientes précédemment décrite dans l'article 1. (Poulard et al., 2012). Sur 154 de ces tumeurs humaines mammaires, pour lesquelles nous avons étudié le statut du complexe mER α /Src/PI3K en Duolink, l'étude par immunohistochimie de LKB1 a été entreprise. De façon intéressante, nous avons observé une double localisation de LKB1, nucléaire et cytoplasmique, associée à des pronostics de survie

différents. Ces localisations sont inversement corrélées. L'expression de LKB1 dans le noyau est un marqueur de bon pronostic alors que l'expression de LKB1 dans le cytoplasme est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Dans le but de comprendre le mécanisme expliquant cette double localisation de LKB1, nous l'avons étudié dans différentes lignées cellulaires mammaires. Etant donné que nous n'avons pas trouvé d'anticorps anti-LKB1 qui fonctionne en immunofluorescence, nous avons entrepris l'étude de la localisation de LKB1 dans les lignées cellulaires à l'aide de la technique du Duolink. Dans ce cas, nous utilisons un anticorps primaire ciblant notre protéine d'intérêt, puis deux sondes PLA anti-lapin (une plus et une moins). Cela permet de quantifier et surtout de localiser *in vivo* la protéine LKB1. Ainsi, nous avons pu étudier la localisation de LKB1 dans différentes lignées cellulaires mammaires humaines. Dans la plupart des lignées, LKB1 est localisée en majorité dans le cytoplasme des cellules. Cependant, dans les lignées ZR-75.1 et Cama-1, on retrouve LKB1 dans le noyau. Des données bibliographiques indiquent que la phosphorylation de la sérine 334 de LKB1 induit sa séquestration dans le noyau. Pour cela, nous avons étudié cette phosphorylation en Western-blot sur les lignées cellulaires et avons pu montrer une corrélation entre la phosphorylation de la sérine 334 de LKB1 et sa localisation nucléaire sur les lignées étudiées. Cependant, l'anticorps anti-LKB1 S334 ne fonctionne pas en immunohistochimie. De ce fait, nous n'avons pas pu démontrer que la localisation de LKB1 dans les tumeurs est corrélée à cette phosphorylation. On ne peut donc pas exclure l'existence d'un autre mécanisme.

Lorsque LKB1 est localisée dans le cytoplasme, nous avons démontré qu'il interagit avec le complexe mER α /Src/PI3K, dans les lignées cellulaires et les tumeurs mammaires humaines. De plus, une étude statistique a montré que l'expression de LKB1 cytoplasmique est corrélée à celle du complexe non génomique mER α /Src/PI3K, ainsi qu'à l'activation d'Akt. Ces données n'ont pas pu être confirmées par co-immunoprécipitation dans des échantillons cliniques pour des raisons techniques. Cela supporte l'implication de LKB1 dans la signalisation non génomique œstrogéno-dépendante. Lorsque LKB1 est localisée dans le cytoplasme, associée au complexe mER α /Src/PI3K, son expression est un facteur indépendant de mauvais pronostic alors que l'expression nucléaire de LKB1 est associée à un bon pronostic.

Sachant que LKB1 est un suppresseur de tumeurs, nos résultats semblent en désaccord avec les données bibliographiques. Mais, la double localisation de LKB1, cytoplasmique *versus* nucléaire, pourrait expliquer en partie ces différences. En effet, une forte expression de LKB1 peut être associée à un bon pronostic, en adéquation avec le rôle de LKB1 en tant que suppresseur de tumeurs et une forte expression de LKB1 dans le cytoplasme peut être associée à un mauvais pronostic. De façon intéressante, nous avons montré que l'expression de p-4E-BP1, une cible de mTor1, corrèle avec l'expression de LKB1 cytoplasmique. Or, LKB1 régule cette voie de signalisation (**Figure 47**). p-4E-BP1 est normalement activée lorsque LKB1 est inhibée (Corradetti et al., 2004; Shaw et al., 2004). A la vue de ces données, on peut spéculer que cette forme de LKB1 est inactive dans le cytoplasme. Une mutation inactivatrice pourrait expliquer cela. En effet, les patientes atteintes de PJS présentent un risque de développer un cancer du sein augmenté de 54%. Cependant, aucune mutation somatique de LKB1 n'est retrouvée dans les

tumeurs du sein sporadiques. Par contre, le fait que p-4E-BP1 soit retrouvée très phosphorylée dans les tumeurs présentant une forte expression de LKB1 cytoplasmique conforte notre hypothèse que LKB1 puisse être fonctionnellement inactif dans ces tumeurs, probablement par séquestration dans le complexe mER α /Src/PI3K. Toutefois, on ne peut pas exclure une activité fonctionnelle de LKB1 dans le complexe mER α /Src/PI3K indépendamment de son activité inhibitrice de la voie mTor.

- (i) Une étude phospho-protéomique afin de déterminer les signalisations impliquées *en aval*, a été entreprise. Cette technique est basée sur l'utilisation de puces qui sont composées d'environ 270 anticorps spécifiques de certains sites de phosphorylation de protéines et 540 anticorps pan-spécifiques caractérisant une grande partie des voies de signalisations connues. Nous avons comparé le niveau de phosphorylation des protéines après stimulation œstrogénique en présence ou en absence de LKB1 dans les cellules MCF-7. De nombreuses protéines exerçant un rôle dans l'apoptose ont ainsi été identifiées. Ces résultats confirment les données de Zhong et al. qui ont démontré que LKB1 est requis pour la phosphorylation de Bad, signal anti-apoptotique, dans des cellules tumorales pulmonaires et coliques (Zhong et al., 2008). LKB1 dans le complexe mER α /Src/PI3K pourrait médier la survie cellulaire. Ces données de phospho-protéomiques doivent être validées dans des cellules tumorales mammaires.
- (ii) ER α possède des sites consensus L-X-T/S de phosphorylation par LKB1 dans les domaines ER1 (domaine A/B de ER α) et ER3 (domaine E et F de ER α). Afin de déterminer si LKB1 phosphoryle ER α , Src ou PI3K (p85), nous avons entrepris des tests de phosphorylation *in vitro* à l'aide du complexe recombinant LKB1/STRAD/Mo25. Nous avons ainsi démontré que LKB1 est capable de phosphoryler ER α dans le domaine ER1 et ER3, ainsi que PI3K et Src. Cela pourrait permettre de réguler les voies non génomiques œstrogéno-dépendantes *via* la phosphorylation des membres du complexe mER α /Src/PI3K. Ces résultats doivent être validés dans un contexte cellulaire.

III- JMJD6 déméthylase de ER α

a- Introduction

La méthylation de ER α est un processus dynamique, rapide et transitoire. De plus, ER α est retrouvée hyperméthylée dans 50% des tumeurs du sein, suggérant que ce processus est dérégulé dans certaines tumeurs mammaires et pourrait peut être participer au développement du cancer du sein. Il apparaît donc extrêmement important de comprendre le mécanisme moléculaire qui régule cette méthylation. L'hypothèse d'une dégradation de la forme méthylée de ER α par le protéasome a dans un premier temps été suspectée, puis écartée (Le Romancer et al., 2008). La méthylation de ER α est une diméthylation asymétrique, ce qui écarte tout processus de déimination. Il semblerait donc que seule une déméthylation peut réguler ce processus. De ce fait, après l'identification de la première histone arginine déméthylase (Chang et al., 2007), nous avons voulu tester son implication dans la régulation de la méthylation de ER α .

Comme nous l'avons décrit précédemment, JMJD6 était connu comme le récepteur à la phosphatidylsérine (PSR), une protéine permettant le recrutement des cellules phagocytaires aux sites apoptotiques (Fadok et al., 2000). Par la suite PSR a été renommé JMJD6 du fait de la présence du domaine JmjC dans la protéine, qui est caractéristique des lysines déméthylases et des hydroxylases. Suite à cela, l'équipe de Bruick a identifié que JMJD6 était capable de déméthyliser les histones H3 et H4 sur des résidus arginines diméthylées asymétriquement ou symétriquement (Chang et al., 2007). A ce moment là, JMJD6 était la seule déméthylase capable de réverser la diméthylation d'histones méthylées sur résidus arginines. Six ans plus tard, JMJD6 reste la seule arginine déméthylase décrite.

Cependant, durant ces années une controverse concernant son activité est née. L'activité déméthylase sur des arginines diméthylées symétriquement a été remise en question (Boeckel et al., 2011; Webby et al., 2009), et certains auteurs ont décrits que JMJD6 possède une activité lysyl hydroxylase (Mantri et al., 2010; Unoki et al., 2013; Webby et al., 2009).

La problématique de ce travail était donc double.

Après avoir identifié une interaction entre JMJD6 et ER α , nous souhaitons déterminer s'il existe une relation fonctionnelle entre l'arginine déméthylase JMJD6 et la méthylation de ER α . Ceci dans le but de déterminer si JMJD6 régule la méthylation de ER α , et de ce fait la formation du complexe mER α /Src/PI3K.

Cependant pour réaliser ce travail nous devons déterminer si JMJD6 était ou non une déméthylase. Nous nous sommes focalisé sur la méthylation asymétrique. En effet, ER α est méthylé sur l'arginine 260 par PRMT1, l'arginine méthyltransférase asymétrique majoritaire de la cellule. De ce fait, nous avons étudié la déméthylation par JMJD6 de l'histone H4 diméthylé asymétriquement sur l'arginine 3 en parallèle de celle de ER α méthylé sur l'arginine 260.

Pour ce travail, différents modèles cellulaires ER α + ont été utilisés : (i) la lignée MCF-7 issue d'un adénocarcinome mammaire, transfectée avec des vecteurs antiviraux shRNA dirigés contre JMJD6 permettant l'inhibition stable de l'expression de JMJD6, (ii) la lignée ZR-75.1 issue d'un adénocarcinome mammaire, (iii) la lignée Cama-1 isolée à partir d'une effusion pleurale maligne d'un site métastatique dérivant d'un adénocarcinome.

L'étude du rôle fonctionnel de l'interaction entre ER α et JMJD6 a permis de montrer que JMJD6 déméthyle mER α . Ces résultats sont décrits dans l'article n°3 intitulé « *JMJD6 regulates ER α methylation on arginine* ».

b- Article 3

JMJD6 regulates ER α methylation on arginine.

Coralie Poulard, Juliette Rambaud, Nader Hussein, Laura Corbo, Muriel Le Romancer

Article en préparation de soumission

JMJD6 regulates ER α methylation on arginine

Coralie Poulard^{1,2,3,4,5}, Juliette Rambaud^{1,2,3,4,5}, Nader Hussein⁶, Laura Corbo^{1,2,3,4,5} and Muriel Le Romancer^{1,2,3,4,5}

1 Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

2 Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

3 Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

4 CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

5 Equipe Labellisée « La Ligue »,

6. Lebanese University, Faculty of Sciences, Lebanon.

Address for all correspondence and requests for reprints to: Muriel Le Romancer, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Bâtiment D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: 00 33 4 78 78 28 22. Fax: 00 33 4 78 78 27 20. E-mail: muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

Running Title: JMJD6 regulates ER α methylation

Abstract

ER α functions are tightly controlled by numerous post-translational modifications including arginine methylation, which is required to mediate the extranuclear functions of the receptor. We report that upon oestrogenic stimulation, JMJD6, the only arginine demethylase described so far, interacts with and regulates methylated ER α (metER α) function. Moreover, by combining the silencing of JMJD6 with demethylation assays, we show that metER α is a new substrate for JMJD6. We propose that the demethylase activity of JMJD6 is a decisive regulator of the rapid physiological responses to oestrogen.

Keywords: oestrogen receptor, arginine methylation, arginine demethylation, JMJD6.

INTRODUCTION

Oestrogen (17 β -oestradiol, E₂) a member of the steroid hormone family, plays a crucial role in many physiological processes and in disease, namely in breast cancer. The biological actions of oestrogen are mediated through ER α and ER β , which function in the nucleus as ligand-dependent transcription factors promoting gene transcription and the stimulation of cell growth in various tissues, including breast epithelial cells (Deroo and Korach, 2006; Nilsson *et al.*, 2001). In addition to these well-documented effects, oestrogens also activate multiple signal transduction cascades outside of the nucleus via nongenomic signalling. This nongenomic pathway involves growth factor-dependent kinases and adaptor proteins leading to downstream activation of signalling molecules, such as MAPK and Akt (Cabodi *et al.*, 2004; Castoria *et al.*, 2001; Hammes and Levin, 2007; Song *et al.*, 2005). Cellular responses to oestrogens are highly controlled and require the regulation of ER α function through numerous posttranslational modifications that regulate both genomic and nongenomic pathways (For a review, (Le Romancer M. *et al.*, 2011)). Most nongenomic effects of oestrogen are mediated through the recruitment of the tyrosine kinase Src and PI3K (Cabodi *et al.*, 2004; Castoria *et al.*, 2001). Our team has contributed to the understanding of this pathway by demonstrating that arginine methylation of the receptor is prerequisite to oestrogen-induced formation of the ER α /Src/PI3K complex which activates Akt (Le Romancer M. *et al.*, 2008). Recently, we also showed that this pathway is activated in aggressive breast tumours and could constitute a new potential target for therapy (Poulard *et al.*, 2012).

Our finding of ER α methylation being a dynamic process would suggest the involvement of an enzyme that reverses this methylation. We therefore investigated if the only arginine demethylase identified so far, JMJD6, plays a role in this process. The enzymatic activity of this protein was described by Buick's team on histones displaying asymmetrical as well as symmetrical demethylation on arginine residues (Chang *et al.*, 2007). Formerly, JMJD6 was known as the phosphatidylserine receptor (PTDSR) that facilitated recruitment of phagocytic cells to sites of apoptosis (Fadok *et al.*, 2000). Later, PTDSR was renamed Jumonji domain containing 6 (JMJD6) based on the presence of its JmjC domain characteristic of proteins catalyzing Fe (II) and 2-oxoglutarate-dependent hydroxylation or dioxygenase reactions (Chang *et al.*, 2007). Recent publications have shown that JMJD6 also possesses lysyl hydroxylase activity (Mantri *et al.*, 2010; Unoki *et al.*, 2013; Webby *et al.*, 2009).

In this paper, we demonstrate that JMJD6 demethylates the ER α methylated on R260, thereby regulating oestrogen nongenomic signalling. Moreover, global approaches show that JMJD6 also regulates other arginine methylated-proteins confirming that JMJD6 has different enzymatic activities.

RESULTS

JMJD6 specifically interacts with the methylated form of ER α

To investigate a functional link between JMJD6 and ER α , we firstly analysed whether the two proteins could interact. GST pull-down assays indicated strongly that JMJD6 directly associates with ER α (Figure 1A) specifically within the hinge domain (Figure S1). Next, we wished to validate the binding between endogenous JMJD6 and ER α . Because ER α is rapidly methylated after E₂ treatment, we performed reciprocal immunoprecipitation on MCF-7 cells treated with E₂ for the indicated times (Figure 1B and Figure S2). Oestrogen treatment induced a rapid and transient interaction between ER α and JMJD6. Interestingly, the kinetics of interaction were reminiscent of those previously described for ER α methylation on R260 (Le Romancer M. *et al.*, 2008), suggesting that JMJD6 could specifically interact with methylated ER α (metER α). Several additional findings supported this hypothesis: i) siRNA-mediated reduction of the arginine methyltransferase PRMT1 responsible for ER α methylation, impaired both ER α methylation and the ER α /JMJD6 interaction (Figure 1C); ii) depletion of metER α by immunoprecipitation using an antibody specifically recognizing the ER α methylated on R260, also disrupted the ER α /JMJD6 interaction (Figure 1D); and finally, iii) analysis in other breast cancer cell lines showed that the interaction of ER α with JMJD6 was restricted to cells expressing metER α , reinforcing the idea that JMJD6 interacts specifically with metER α (Figure S3).

Altogether these data clearly establish that upon E₂ stimulation, JMJD6 interacts specifically with metER α .

JMJD6 interacts with metER α within the complex metER α /Src/PI3K

The methylation of ER α is a critical upstream signal, required to mediate the interaction of the receptor with Src and the p85 subunit of PI3K, which propagates the signal to downstream transduction cascades responsible for orchestrating cell proliferation and survival. Disappearance of the methylated ER α occurs concomitantly with the dissociation of the complex, leading to the extinction of downstream kinase activation (Le Romancer M. *et al.*, 2008).

In view of these earlier findings, we wondered whether JMJD6 might participate towards regulating the E₂ nongenomic signalling. To test this hypothesis, we performed co-immunoprecipitation experiments on E₂-treated cells. We found that JMJD6 co-precipitated ER α with Src and PI3K. In addition, these interactions were clearly reduced in cells in which JMJD6 had been invalidated (ShJMJD6) (Figure 2A). Interestingly, the kinetics of interactions were concomitant with the kinetics of ER α methylation (Figure 2A) suggesting that the JMJD6/metER α interaction occurs when the receptor is in complex with Src and PI3K. We then examined in which compartment this interaction occurred by Proximity Ligation Assay (PLA). Figure 2B shows that JMJD6 interacted with ER α (panel a) in the cytoplasm of MCF-7 cells, as indicated by the presence of red dots. The signals strongly decreased in MCF-7 cells in which expression of JMJD6 was downregulated (Figure 2B, panel b). The interactions were quantified by counting the number of dots per cell (Figure 2C). The recruitment of JMJD6 seemed to be

mainly mediated by ER α since JMJD6 could only weakly interact or not at all with Src or p85 of PI3K (Figure S4).

To assess whether JMJD6 affects the methylation of ER α on R260, we produced JMJD6-knocked down cells (ShJMJD6). After E₂ treatment, ER α methylation was strongly increased in ShJMJD6 cells compared with in control cells (Figure 2D). Of note, this phenomenon occurred concomitantly with an increase in metER α /Src/PI3K complex (Figure 2E). Taken together, these data strongly suggest that JMJD6 can negatively regulate the methylation of ER α inducing the disruption of the complex and thereby the extinction of the oestrogen rapid signalling pathway.

JMJD6 demethylates asymmetric dimethylation on arginine residues

In light of our finding that JMJD6 binds directly to metER α and regulates its methylation, we wondered whether JMJD6 could demethylate ER α *in vitro*. We performed a demethylation assay using recombinant JMJD6 on ER α methylated *in vitro* by PRMT1 as described (Le Romancer M. *et al.*, 2008). Using a specific antibody directed against ER α asymmetrically methylated on R260 (Figure 3 A left panel), we found that JMJD6 reduced the methylation of ER α R260 (Figure 3A, right panel). However, as described by Bruick, its enzymatic activity remained faint, probably due to the need of a coactivator to potentiate its activity, as has been described for PRMT5 (Friesen *et al.*, 2001;Ho *et al.*, 2013) and for the lysine demethylase LSD1 (Lee *et al.*, 2005). In the same type of assay, recombinant JMJD6 was not able to demethylate the peptide of ER α containing monomethylated K302 (K302me1) (Subramanian *et al.*, 2008) (Figure 3A, lower panel), thus highlighting the specificity of the catalytic activity of the recombinant protein.

Three types of arginine methylation exist in mammalian cells: monomethylarginine (MMA), asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) (Bedford and Clarke, 2009). Considering that histone H4 at arginine 3 (H4R3) is a substrate of JMJD6 and that JMJD6 is able to demethylate ER α *in vitro* as shown above, we tested whether JMJD6 can remove dimethylation from histone H4 methylated *in vitro* by recombinant PRMT1. As shown in Figure 3B, JMJD6 was indeed able to decrease H4R3 ADMA *in vitro*. These results support the role of JMJD6 in the demethylation of the ADMA R3 residue on histone H4. After validation of H4R3me2 antibody (Figure 3C), concordant results were obtained in our *in vivo* test in which, strikingly, knockdown of JMJD6 with two different ShRNAs significantly increased the methylation of H4R3, detected by an antibody recognizing specifically the ADMA R3 of histone H4, when compared with the control cells (Figure 3D, compare lane 2 and 3 to lane 1), while the histone H4 level remained unchanged. Again, immunofluorescence analysis showed an enhanced staining of H4R3 ADMA in the nuclei of knocked down cells compared to control (Figure 3E).

To provide further evidence for the demethylating function of JMJD6, we used two complementary approaches. Firstly, we analysed the global ADMA of total proteins in MCF-7 cells depleted for JMJD6. Cell lysates of cells invalidated for JMJD6 with three different shRNAs were immunoblotted with an antibody recognizing specifically ADMA (meRG). As shown in Figure 3F, knockdown of JMJD6 had a strong effect on the amount of dimethylated proteins (compare lanes 2-4 to lane 1). We confirmed these results with another antibody recognizing ADMA (ASYM24). However, when we analysed SDMA in the same cell extracts, we observed no

difference suggesting that JMJD6 activity may specifically target asymmetric dimethylation (Figure 3F, lower panel). Next, we identified putative JMJD6 partners by immunoprecipitation of MCF-7 transfected with JMJD6, coupled to mass spectrometry analysis. In agreement with data in the literature (Boeckel *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2010; Webby *et al.*, 2009) most of the identified proteins were RNA binding proteins implicated in RNA processing. Interestingly, 23/25 proteins identified have been shown to be methylated on arginine residues (Table 1), adding further evidence for JMJD6 binding and regulate ADMA.

Altogether, these data support the notion that JMJD6 may have a dual enzymatic role, as arginine demethylase and hydroxylase, and participate in various regulation pathways. Significantly, our results have shown that JMJD6 may function as an arginine demethylase for histone and, for the first time, for a non-histone target. Specifically JMJD6 negatively regulates ER α nongenomic signalling. After E₂ treatment the methylation of ER α at R260 is crucial to propagate the signal to downstream transduction cascades. We therefore propose that the demethylase activity of JMJD6 is a decisive regulator of the rapid physiological responses to oestrogen, inducing the extinction of downstream kinase activation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and GST-fusion proteins

GST-parallel-JMJD6 were gifts from Bruick (Chang *et al.*, 2007). GST-PRMT1, GST-ER176-302, GST-ER297-595, GST-ER176-251, GST-ER251-305 and GST-ER251-305 were produced as described (Robin-Lespinasse *et al.*, 2007).

Cell culture and transfections

MCF-7, ZR75-1 and Cama-1 mammary cells were maintained at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum 1% non-essential amino acids. Prior to experiments, cells were grown for 48 hr in phenol red-free DMEM and 10% charcoal-treated serum (Biowest).

The siRNA sequences targeting PRMT1 correspond to the coding regions 650-668 and have already been described (Le Romancer M. *et al.*, 2008). 50 nM of PRMT1 specific siRNAs or the scrambled siRNA (Eurogentec) were transfected into MCF-7 cells (1×10^6) using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's guidelines. 72 hr after transfection, cells were lysed in RIPA buffer containing 50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, and 0.25% deoxycholate.

Antibodies

| Antibodies | Species | Company | Dilution WB | Dilution IF/PLA |
|----------------------|---------|------------------|----------------|--------------------|
| GAPDH (H86504M) | Mouse | BD International | 1/25000 | |
| ER α (04-820) | Rabbit | Millipore | 1/1000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--------|----------------------------|--------|-------|
| ER α (sc-8005) | Mouse | Santa Cruz | 1/1000 | |
| ER α (sc-544) | Rabbit | Santa Cruz | 1/500 | |
| JMJD6 (ab10526) | Rabbit | ab10526 Abcam | 1/1000 | 1/400 |
| JMJD6 (sc-28348) | Mouse | Santa Cruz | 1/500 | |
| PRMT1 (24333) | Rabbit | Millipore | 1/4000 | |
| PRMT5 (07-405) | Rabbit | Millipore | 1/1000 | |
| H4R3me2 (#39705) | Rabbit | Active motif | 1/1000 | 1/200 |
| meRG (#800002) | Rabbit | CH ₃ Biosystems | 1/1000 | |
| Asym24 (07-414) | Rabbit | Millipore | 1/4000 | |
| Sym10 (07-412) | Rabbit | Millipore | 1/1000 | |
| ER α R260me2 or metER α | Mouse | Home made | 1/1000 | |
| PI3K p85 (06-195) | Rabbit | Millipore | 1/9000 | |
| ER α K302me1 | Rabbit | Gift from P. Vertino | 1/5000 | |
| Src (sc-8056) | Mouse | Santa Cruz | 1/1000 | 1/150 |
| Src (2109) | Rabbit | Cell Signaling Technology | 1/1000 | |

JMJD6 stable knockdown using lentiviral short hairpin RNA

Three pre-made lentiviral short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting human JMJD6 and one negative control construct created in the same vector backbone (pLKO.1-Puro) were purchased from SIGMA. Puromycin selection (1 μ g/mL) was started 48 h after lentiviral infection.

GST-pull-down assay

Psg5-ER α and pCDNA3-JMJD6 plasmid were transcribed and translated *in vitro* using T7-coupled reticulocyte lysate (Promega), in the presence of [³⁵S]methionine. Labelled proteins were incubated with 10 μ g of purified recombinant GST- fusion proteins in 200 μ l of binding buffer (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 0.1M, EDTA 1mM, glycerol 10%, Igepal 0.25%) with 1mM DTT and 1% milk) for 2 h at room temperature. Beads were washed three times in binding buffer, and then bound proteins were resolved on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and visualized by autoradiography.

Affinity purification and mass spectrometry

MCF-7 cells were transiently transfected with V5-tagged JMJD6. Cell extracts were purified with agarose beads coupled to V5 antibody and loaded on SDS-PAGE. After elution, proteins were digested by trypsin and peptides were analysed by LC/MS/MS at IBCP, Lyon.

Immunoprecipitation and western blotting

To study the effect of oestrogen, the cells were treated for different times with E₂ (Sigma). After treatment, cells were lysed in RIPA buffer. Protein extracts were incubated with primary antibodies overnight at 4°C with shaking. Protein A-agarose or protein L-agarose beads were added and incubated 1 h at 4°C. The immunoprecipitates were separated on SDS-PAGE. The proteins were visualized by an enhanced chemiluminescence kit (Roche Molecular Biochemicals) following the manufacturer's instructions.

For histone extraction, cells were lysed in a solution containing 3% of SDS and 10% of β -mercaptoethanol for 2 min at 95°C, then cooled in ice. After addition of DNAase, the samples were loaded on SDS-PAGE.

Methylation and demethylation assays

The *in vitro* methylation protocol has been described previously (Le Romancer M. *et al.*, 2008). The demethylation assay was performed as described for methylated histones (Chang *et al.*, 2007). We also used GST-hinge-ER α methylated by PRMT1 and purified on microspin columns to remove SAM or a peptide corresponding to amino acids 297-308 non methylated or monomethylated on K302. Then, GST-JMJD6 or GST was incubated at 37°C for 1h and the reaction products were assayed by western blot analysis or by autoradiography.

Proximity ligation assay

This technology developed by Olink Bioscience (Sweden) allows the visualisation of protein/protein interactions *in situ* and was first published in 2006 (Soderberg *et al.*, 2006). The experiments were performed following the manufacturer's instructions and have been previously described (Poulard *et al.*, 2012).

The hybridized fluorescent slides were viewed under a Leica DM6000B microscope. Images were acquired under identical conditions at objective X63. For each sample, at least one hundred cells were counted. Analyses and quantifications of these samples were performed using Image J software.

Acknowledgements

We thank R. Bruick for providing JMJD6-expressing plasmids. We also thank P. Vertino for the ER α peptides and anti-metER α on lysine. Thanks are also due to Cécile Languilaire and Farida Nasri for their technical assistance. The team is sponsored by la ligue contre le cancer. This study was also supported by the Association pour la recherche sur le cancer. C.P. was supported by a fellowship from the French Ministry of Research and now from Fondation Cancer.

Author contributions:

CP, JR and NH performed the experiments. CP, LC and MLR analysed the results. MLR and LC wrote the paper.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCE LIST

1. Bedford MT and Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*, 33, 1-13.
2. Belyanskaya LL, Gehrig PM, and Gehring H (2001) Exposure on cell surface and extensive arginine methylation of ewing sarcoma (EWS) protein. *J Biol Chem*, 276, 18681-18687.
3. Boeckel JN, Guarani V, Koyanagi M, Roexe T, Lengeling A, Schermuly RT, Gellert P, Braun T, Zeiher A, and Dimmeler S (2011) Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 3276-3281.
4. Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, and Defilippi P (2004) p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci*, 117, 1603-1611.
5. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di DM, de FA, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, and Auricchio F (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J*, 20, 6050-6059.
6. Chang B, Chen Y, Zhao Y, and Bruick RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*, 318, 444-447.
7. Deroo BJ and Korach KS (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 116, 561-570.
8. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, and Henson PM (2000) A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*, 405, 85-90.
9. Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van DG, Rappsilber J, Mann M, and Dreyfuss G (2001) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*, 21, 8289-8300.
10. Hammes SR and Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*, 28, 726-741.
11. Ho MC, Wilczek C, Bonanno JB, Xing L, Seznec J, Matsui T, Carter LG, Onikubo T, Kumar PR, Chan MK, Brenowitz M, Cheng RH, Reimer U, Almo SC, and Shechter D (2013) Structure of the arginine methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. *PLoS One*, 8, e57008.
12. Hong X, Zang J, White J, Wang C, Pan CH, Zhao R, Murphy RC, Dai S, Henson P, Kappler JW, Hagman J, and Zhang G (2010) Interaction of JMJD6 with single-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14568-14572.
13. Hornbeck PV, Kornhauser JM, Tkachev S, Zhang B, Skrzypek E, Murray B, Latham V, and Sullivan M (2012) PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic Acids Res*, 40, D261-D270.

14. Jung SY, Li Y, Wang Y, Chen Y, Zhao Y, and Qin J (2008) Complications in the assignment of 14 and 28 Da mass shift detected by mass spectrometry as in vivo methylation from endogenous proteins. *Anal Chem*, 80, 1721-1729.
15. Kolbel K, Ihling C, Bellmann-Sickert K, Neundorf I, Beck-Sickinger AG, Sinz A, Kuhn U, and Wahle E (2009) Type I Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT-3 Act Distributively. *J Biol Chem*, 284, 8274-8282.
16. Lapeyre B, Amalric F, Ghaffari SH, Rao SV, Dumbar TS, and Olson MO (1986) Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J Biol Chem*, 261, 9167-9173.
17. Le Romancer M., Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, and Corbo L (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev*, 32, 597-622.
18. Le Romancer M., Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, and Corbo L (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell*, 31, 212-221.
19. Lee MG, Wynder C, Cooch N, and Shiekhattar R (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, 437, 432-435.
20. Mantri M, Krojer T, Bagg EA, Webby CJ, Butler DS, Kochan G, Kavanagh KL, Oppermann U, McDonough MA, and Schofield CJ (2010) Crystal structure of the 2-oxoglutarate- and Fe(II)-dependent lysyl hydroxylase JMJD6. *J Mol Biol*, 401, 211-222.
21. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, and Gustafsson JA (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81, 1535-1565.
22. Ong SE, Mittler G, and Mann M (2004) Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods*, 1, 119-126.
23. Pahlich S, Bschrir K, Chiavi C, Belyanskaya L, and Gehring H (2005) Different methylation characteristics of protein arginine methyltransferase 1 and 3 toward the Ewing Sarcoma protein and a peptide. *Proteins*, 61, 164-175.
24. Poulard C, Treilleux I, Lavergne E, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard-Leon S, Chabaud S, Tredan O, Corbo L, and Le RM (2012) Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol Med*.
25. Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Kolytcheff C, Rostan MC, Corbo L, and Le RM (2007) hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J Cell Sci*, 120, 638-647.
26. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, and Landegren U (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 3, 995-1000.
27. Song RX, Zhang Z, and Santen RJ (2005) Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 347-353.

28. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, Peng J, Cheng X, and Vertino PM (2008) Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell*, 30, 336-347.
29. Uhlmann T, Geoghegan VL, Thomas B, Ridlova G, Trudgian DC, and Acuto O (2012) A method for large-scale identification of protein arginine methylation. *Mol Cell Proteomics*, 11, 1489-1499.
30. Unoki M, Masuda A, Dohmae N, Arita K, Yoshimatsu M, Iwai Y, Fukui Y, Ueda K, Hamamoto R, Shirakawa M, Sasaki H, and Nakamura Y (2013) Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6). *J Biol Chem*, 288, 6053-6062.
31. Webby CJ, Wolf A, Gromak N, Dreger M, Kramer H, Kessler B, Nielsen ML, Schmitz C, Butler DS, Yates JR, III, Delahunty CM, Hahn P, Lengeling A, Mann M, Proudfoot NJ, Schofield CJ, and Bottger A (2009) Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science*, 325, 90-93.

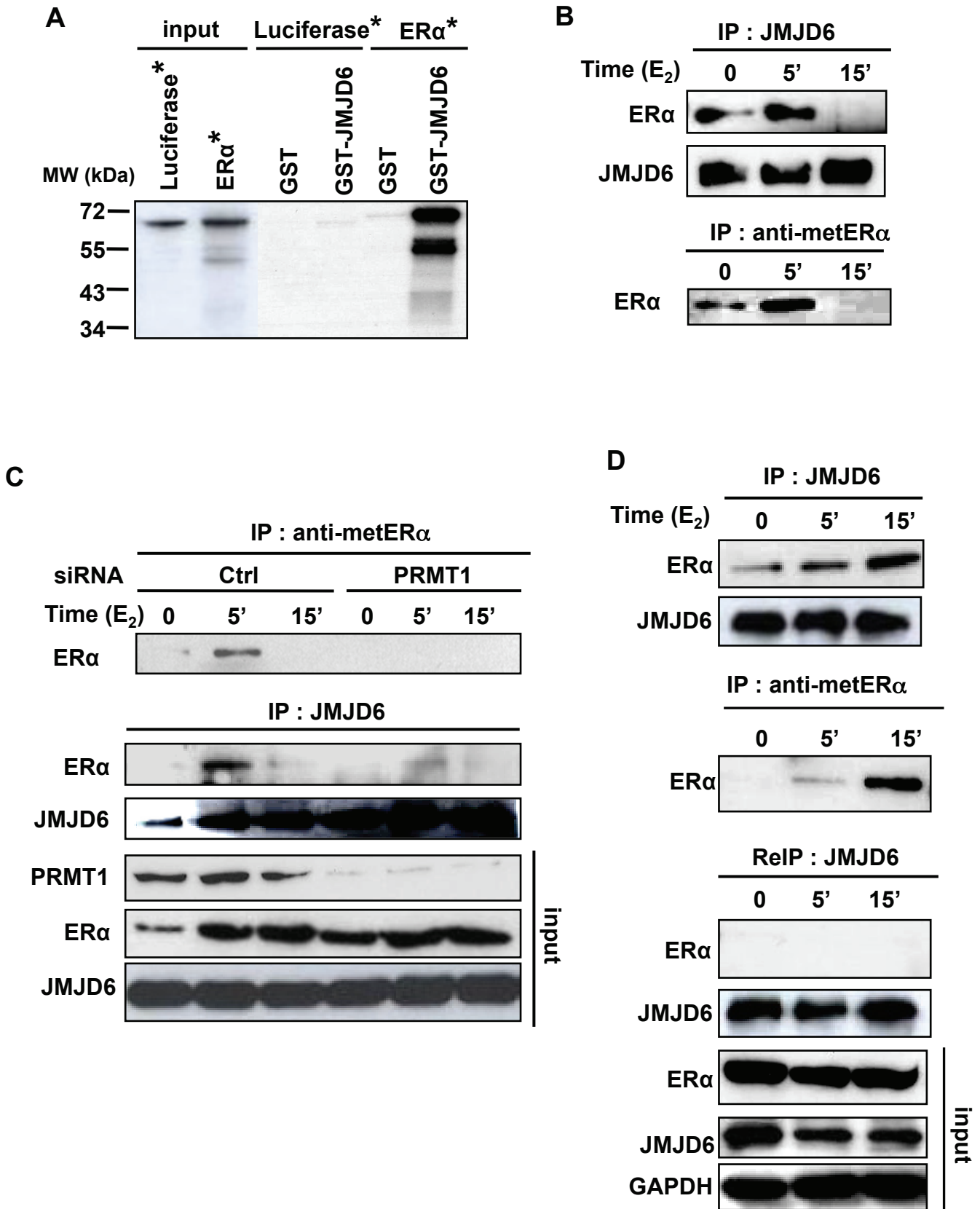


Figure 1

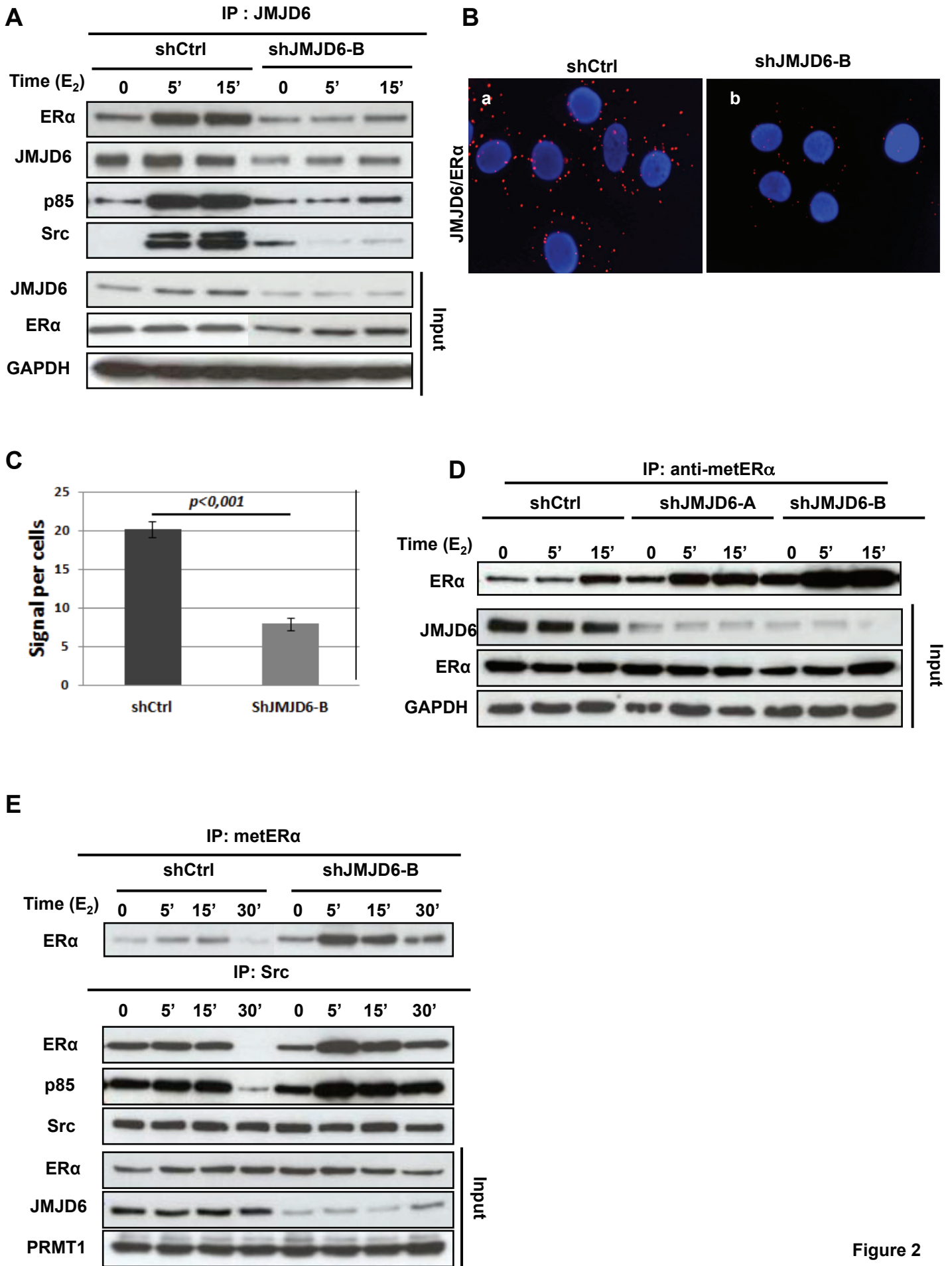


Figure 2

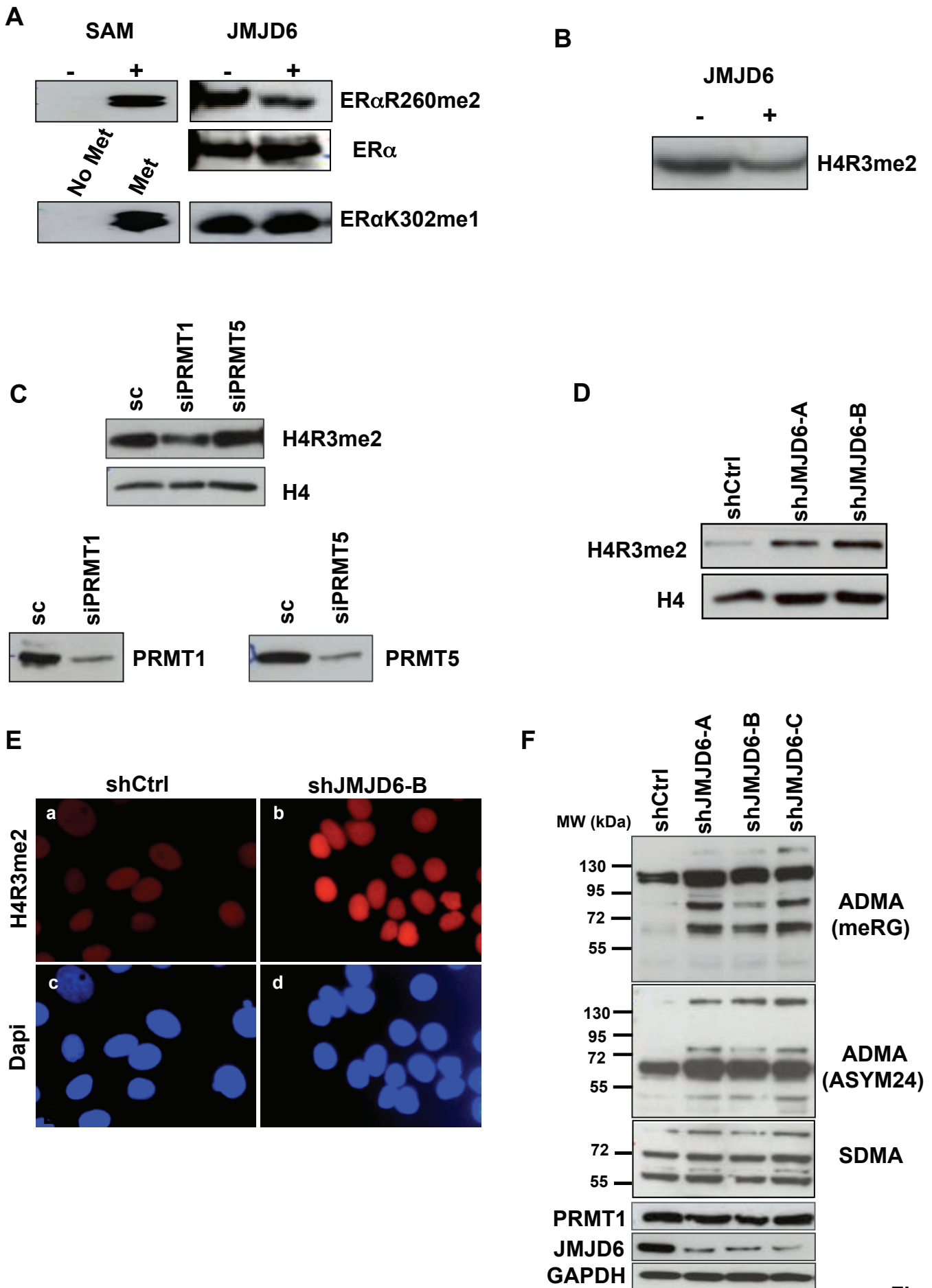


Figure 3

Table 1

| | | | | |
|---------------------------------------------------|--------|---------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------|
| hnRNP U-like protein 1 | Q9BUJ2 | mRNA processing | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| hnRNP K | P61978 | mRNA processing | DMA, MMA | (Kolbel <i>et al.</i> , 2009;Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| hnRNP L | P14866 | mRNA processing | MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| hnRNP Q | O60506 | mRNA processing | MMA, DMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| U1 snRNP 70 | P08621 | mRNA processing | MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| RNA helicase (DDX3) | O00571 | mRNA processing | DMA, MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| RNA helicase (DDX5) | P17844 | mRNA processing | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| RNA helicase (DDX17)* | Q92841 | mRNA processing | MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| Paraspeckle protein 2 (PSP2) | Q96PK6 | mRNA processing | MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| PTB-associated-splicing factor (SFPQ) | P23246 | mRNA processing | DMA, MMA | (Ong <i>et al.</i> , 2004;Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| Non-POU domain-containing octamer-binding protein | Q15233 | mRNA processing | MMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| RNA-binding protein (FUS) | P35637 | mRNA processing | DMA, MMA | (Ong <i>et al.</i> , 2004;Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| RNA-binding protein (EWS) | Q01844 | mRNA processing | DMA, MMA | (Belyanskaya <i>et al.</i> , 2001;Pahlich <i>et al.</i> , 2005) |
| Splicing factor HCC1 * | Q14498 | mRNA processing | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| Poly(U)-binding-splicing factor(PUF60)* | Q9UHX1 | mRNA processing | | |
| Paraspeckle component 1 (PSPC1) | Q8WXF1 | transcription | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| TATA-BP-associated factor 2N TAF15 | Q92804 | transcription | DMA, MMA | (Ong <i>et al.</i> , 2004;Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| Arg-methyltransferase (CARM1) | Q86X55 | transcription | DMA, MMA | (Jung <i>et al.</i> , 2008) |
| Poly(A)-binding protein 1 (PABP1) | P11940 | translation | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| Poly(A)-binding protein 4 (PABP4) | Q13310 | Translation | DMA | (Ong <i>et al.</i> , 2004) |
| Ras GTPase-activating BP1 | Q13283 | translation | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |
| SMARCD2 | Q92925 | Chromatin structure | DMA | (Hornbeck <i>et al.</i> , 2012) |
| nucleolin | P19338 | mRNA processing/nucleolus | DMA | (Lapeyre <i>et al.</i> , 1986) |
| Protein transport protein Sec23B | Q15437 | Endosome trafficking | | |
| TFG | Q92734 | unknown | DMA, MMA | (Uhlmann <i>et al.</i> , 2012) |

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: JMJD6 specifically interacts with the methylated form of ER α

(A) *In vitro* synthesized and radiolabelled ER α protein was incubated with GST-JMJD6 and binding was analysed by autoradiography. Luciferase was used as a negative control. **(B)** MCF-7 were treated with E₂ for the indicated times and the interaction of JMJD6 with ER α was analysed by immunoprecipitation. On the same extract methylated ER α (metER α) was studied by immunoprecipitation with the anti-metER α revealed with an anti-ER α . **(C)** PRMT1 is essential to JMJD6/ER α interaction. Lysates of MCF-7 cells transfected with control siRNAs or with specific PRMT1 siRNAs were treated with vehicle or E₂ (10⁻⁸M), analysed for ER α methylation and immunoprecipitated with the anti-JMJD6 antibody before analysis with the indicated antibodies. The amount of ER α , JMJD6 and PRMT1 in the different samples was determined by western blot in the input. **(D)** JMJD6 interacts specifically with metER α . MCF-7 treated with E₂ as above were lysed and analysed for JMJD6/ER α interaction. In parallel, cell extracts were immunoprecipitated with metER α antibody. Unbound fractions were then used for a second immunoprecipitation using anti-JMJD6 antibody followed by western blotting with anti-ER α and anti-JMJD6 antibodies. The amount of ER α and JMJD6 in the different samples was determined by western blot in the input.

Figure 2: JMJD6 interacts with metER α within the complex metER α /Src/PI3K

(A) ER α , Src and PI3K coimmunoprecipitate with JMJD6. Lysates of MCF-7 cells, control cells (shCtrl), and JMJD6 knockdown cells (shJMJD6) were immunoprecipitated with JMJD6 antibody. The immunoprecipitates were then blotted with antibodies against PI3K (p85), Src, ER α and JMJD6. The amount of ER α , Src and p85 (PI3K) in the different samples was determined by western blot. **(B)** Detection of endogenous interaction between JMJD6 and ER α by PLA. MCF-7 cells were incubated with E₂ 10⁻⁸M for 5 min. After fixation, *in situ* PLA for JMJD6/ER α was performed using antibodies raised against JMJD6 and ER α (panels a,b). The detected dimers are represented by red dots. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X63). **(C)** Quantification of the number of signals per cell was performed by computer-assisted analysis as reported in the Materials and Methods. The mean +/- s.e.m. of four experiments is shown. P-value was determined by Student's t-test. **p<0.01 indicates statistically significant difference. **(D)** ER α methylation was analysed after E₂ stimulation on control (shctrl) and shJMJD6 cells (as described in Figure 1B). The amount of ER α , JMJD6 and GAPDH in the different samples was determined by western blot. **(E)** ER α methylation was analysed after E₂ stimulation on control and ShJMJD6 cells as in D and from the same extracts, immunoprecipitation with anti-src antibody was performed. The presence of ER α and p85 was then analysed. The amount of ER α , p85 and PRMT1 were determined in the inputs.

Figure 3: JMJD6 demethylates asymmetric dimethylation on arginine residues

(A) GST-ER α fragment (251-305) was methylated by PRMT1, and a demethylation assay was performed as described above. Western blot was performed with the anti-ER α R260me2 antibody and an anti-ER α antibody recognizing the hinge domain (G20) (upper panel). Under the

same conditions, demethylation was assessed on an ER α peptide methylated on K302 and recognized by the antibody anti- ER α K302me1. **(B)** Histone H4 was incubated with GST-PRMT1 in the presence of [methyl- 3 H] SAM. A demethylation assay was then performed in the presence of GST-JMJD6 or GST. Reaction products were analysed by SDS-PAGE followed by fluorography. **(C)** Acid extracted-histones from MCF-7 cells, control cells (sc) and PRMT knockdown cells (siPRMT1 and siPRMT5) were analysed by western blot with an antibody recognizing specifically the asymmetric methylation of arginine 3 of Histone H4. Control western blotting was performed with anti-PRMT1 and anti-PRMT5. **(D)** Acid extracted-histones from MCF-7 cells, control cells (shCtrl) and JMJD6 knockdown cells (shJMJD6A and B) were analysed by western blot with an antibody recognizing specifically the asymmetric methylation of arginine 3 of Histone H4. Control western blotting was performed with anti-histone H4. **(E)** H4R3me2 was also analysed by immunofluorescence in the same cells as described above. DAPI staining is shown in panels c and d. **(F)** Lysates of control and shJMJD6 cells were analysed by western blotting with antibodies recognizing asymmetric dimethylation (MeRG and ASYM24) and symmetric dimethylation (SYM10). Controls were performed with anti PRMT1, JMJD6 and GAPDH antibodies.

Table 1: Potential interacting proteins of JMJD6 identified by affinity purification and mass spectrometry.

MMA: monomethylarginine. DMA: dimethylarginine. The bold characters highlight arginine methylated proteins. * indicate proteins already identified as JMJD6 putative partners (ref).

Supplemental Data

JMJD6 regulates ER α methylation on arginine

Coralie Poulard, Juliette Rambaud, Nader Hussein, Laura Corbo and Muriel Le Romancer

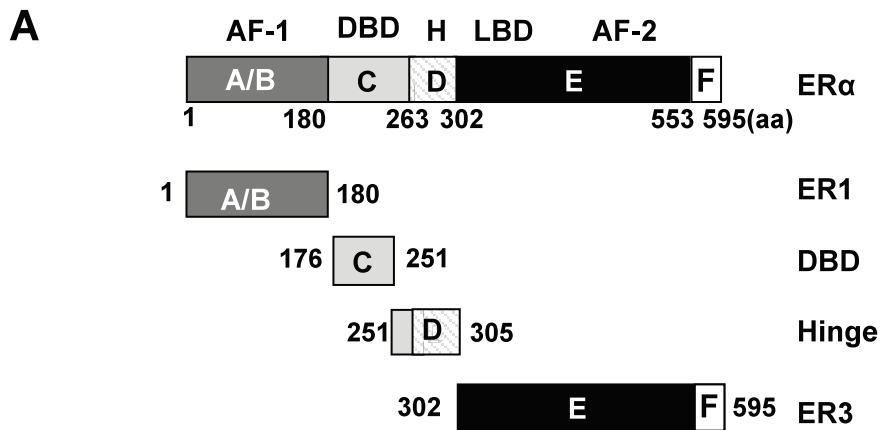


Fig. S1: Identification of domains of ER α interacting with JMJD6.

A) The organization of ER α protein showing the functional domains ER α displays conserved functional domains. A/B including AF-1 (Activation Function 1), C containing the DBD (DNA binding domain), D called Hinge domain including nuclear localization signals, E containing the LBD (Ligand binding domain) and AF-2 (Activation Function 2) and F allowing agonist/antagonist regulation.

B) Radioactive JMJD6 (*) was incubated with GST and with the different domains of ER α coupled with GST, and the bound proteins were visualized by autoradiography.

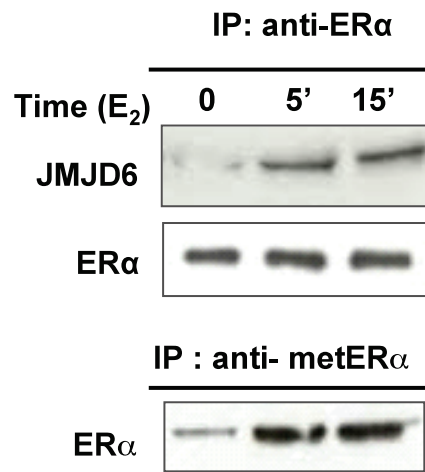


Fig. S2: JMJD6/ER α interaction in MCF-7cells.

Immunoprecipitation was performed from E₂-treated MCF-7 cell extracts with anti-ER α antibody and revealed with anti-ER α and anti-JMJD6 antibodies.

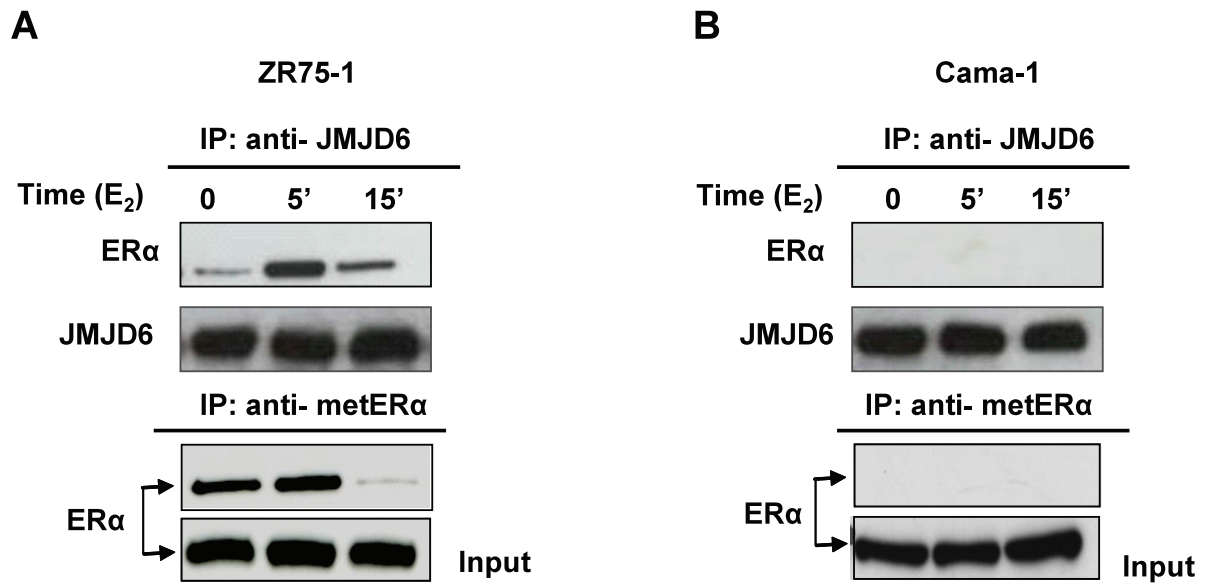


Fig. S3: JMJD6/ER α interaction in human breast cancer cells.

ZR75-1 (A), and Cama-1 (B) cells were analyzed for ER α methylation and JMJD6/ER α interaction. Immunoprecipitation of JMJD6 from extracts of estrogen-deprived cells (t=0) stimulated with 10^{-8} M E₂ for the indicated times was performed followed by western blotting with antibody against ER α and JMJD6. On the same extract metER α was analyzed by immunoprecipitation with the anti metER α revealed with an anti-ER α .

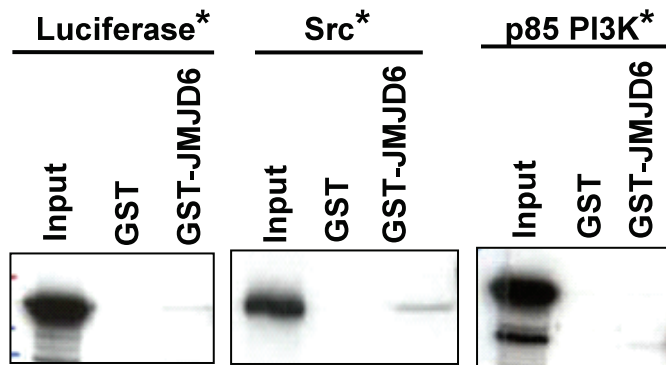


Fig. S4: JMJD6/Src and JMJD6/PI3K interaction in vitro

GST pull down assay of *in vitro* translated ^{35}S -labeled Src or p85 (PI3K) (*) was incubated with GST and GST-JMJD6 and the bound proteins were visualized by autoradiography. Luciferase was used as a negative control.

c- Discussion

La première étape de ce travail a été d'étudier l'interaction entre JMJD6 et ER α . Nous avons ainsi mis en évidence que JMJD6 est un nouveau partenaire de ER α *in vitro* par GST pull-down. Sans une purification à l'homogénéité des protéines, cette expérience ne démontre pas complètement l'interaction directe entre JMJD6 et ER α puisque des protéines bactériennes peuvent induire une interaction indirecte. Cette expérience a été complétée par des expériences de co-immunoprécipitations et de Duolink qui nous ont permis de montrer que JMJD6 et ER α interagissent *in cellulo*. De façon intéressante, JMJD6 interagit avec la forme méthylée de ER α , et coimmunoprécipite ER α avec Src et PI3K. Plus précisément, JMJD6 est recrutée lorsque le complexe mER α /Src/PI3K est formé. Il a été préalablement démontré que la méthylation de ER α a lieu à temps court de stimulation aux œstrogènes, entre 5 et 15 minutes (Le Romancer et al., 2008). Dans tous les cas, la méthylation est un phénomène transitoire, et le signal diminue à 15 ou 30 minutes de stimulation. Dans ce travail, nous avons démontré dans différentes expériences que l'interaction entre ER α et JMJD6 a lieu de façon concomitante avec la méthylation de ER α , que la méthylation ait lieu à 5 ou 15 minutes de stimulation aux oestrogènes.

La seconde étape du travail consistait à étudier si JMJD6 régule la méthylation de ER α sur arginine. Pour cela, nous avons utilisé des lignées inhibées de manière stables pour JMJD6, établies à partir des cellules MCF-7. De façon intéressante, après traitement œstrogénique, la méthylation de ER α est clairement augmentée dans les cellules inhibées de façon stables pour JMJD6 par rapport au contrôle. Cette augmentation de la méthylation est corrélée à une augmentation de la formation du complexe mER α /Src/PI3K. Dans les cellules, JMJD6 est donc capable de réguler la méthylation de ER α , ainsi que la formation du complexe de signalisation non génomique de ER α . Toutefois, pour compléter ce travail, il reste à étudier la voie de signalisation en aval.

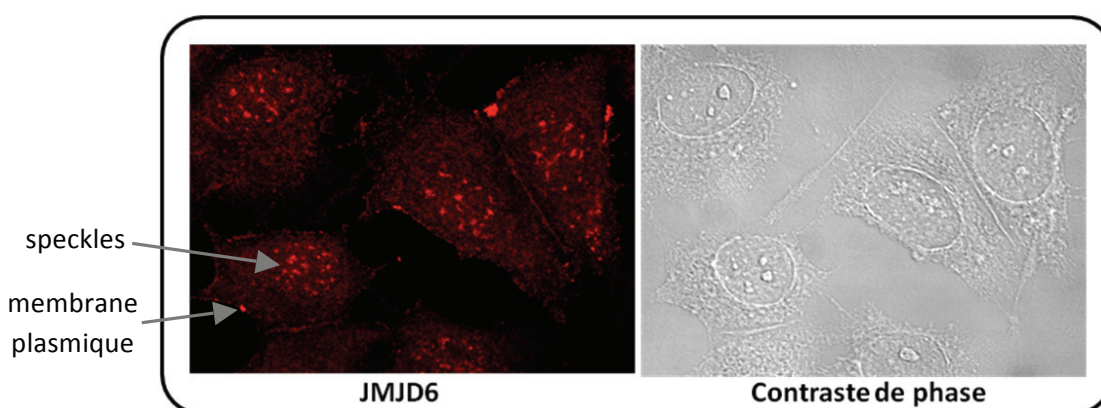


Figure 49 : Localisation de JMJD6 dans les cellules MCF-7

Marquage en immunofluorescence de JMJD6 observé au microscope confocal.

De plus, la technologie du Duolink a permis de démontrer que JMJD6 et ER α interagissent dans le cytoplasme. Cependant, les données bibliographiques sont assez divergentes quant à la localisation de JMJD6. Certains décrivent une localisation membranaire, d'autres une localisation nucléaire et enfin certains parlent d'une localisation différentielle, nucléaire ou cytoplasmique, suivant le contexte cellulaire. Dans les cellules MCF-7, nous avons montré que JMJD6 se localise à différents endroits dans la cellule (**Figure 49**). Nous retrouvons un faible marquage cytoplasmique, un marquage membranaire et un marquage nucléaire. De la même façon que Webby et al. (Webby et al., 2009), des expériences de colocalisation nous ont permis de valider que JMJD6 se localise dans les « speckles », structures nucléaires concentrant de nombreuses protéines méthylées (Robin-Lespinnasse et al., 2007).

Ensuite, grâce à des essais de déméthylation, nous avons démontré que JMJD6 déméthyle spécifiquement ER α méthylé sur l'arginine 260 *in vitro*, alors que l'enzyme n'est pas capable de déméthylé ER α méthylé sur la lysine 302.

En 2007, l'équipe de R. Bruick a démontré que JMJD6 déméthyle l'histone H3 sur l'arginine 2 (H3R2) et l'histone H4 sur l'arginine 3 (H4R3), de façon symétrique et asymétrique (Chang et al., 2007). Dans notre étude, du fait que nous nous intéressons à la diméthylation asymétrique de ER α , nous avons étudié l'activité déméthylase de JMJD6 sur la diméthylation asymétrique de H4R3. Des extractions d'histones et des immunofluorescences nous ont permis de démontrer que la diméthylation de H4R3 est significativement augmentée dans les cellules inhibées pour JMJD6 en comparaison avec les cellules contrôles. L'activité enzymatique *in vitro* de JMJD6 sur l'histone H4 préalablement méthylée par PRMT1 a aussi été validée.

De plus, nous avons étudié la méthylation générale dans les lignées inhibées de façon stable pour JMJD6, grâce à des anticorps généraux qui reconnaissent toutes les diméthylations symétriques ou asymétriques de la cellule. Lorsque nous inhibons JMJD6, la diméthylation asymétrique est significativement augmentée dans les différents clones, alors que la diméthylation symétrique ne varie pas.

L'effet *in vitro* de l'activité de JMJD6, que ce soit sur H4R3 ou mER α est relativement faible mais reproductible (n=3), comme cela a déjà été démontré par l'équipe de Bruick (Chang et al., 2007). Par contre, lorsque l'on inhibe JMJD6 dans les cellules MCF-7, on augmente assez fortement la méthylation générale ainsi que la méthylation de ER α . L'activité *in vitro* de JMJD6 n'est certes pas très efficace, mais on peut supposer que comme pour certaines méthyltransférases ou lysines déméthylases, JMJD6 a besoin de cofacteurs. Par exemple, PRMT5 a besoin de MEP50 pour exercer son activité méthyltransférase (Friesen et al., 2001). De même, il a été bien décrit que LSD1 a besoin de cofacteurs dont Co-REST pour être efficace (Lee et al., 2005c; Shi et al., 2005). Une autre hypothèse pourrait être que la dimérisation de JMJD6 est essentielle à son activité déméthylase. Par exemple, l'activité méthyltransférase de PRMT1 peut être régulée par oligomérisation (Zhang et al., 2003). Concernant JMJD6, il a été démontré que la protéine se dimérise (Han et al., 2012; Wolf et al., 2013). Les auteurs ont démontré que l'oligomérisation de JMJD6 nécessite son activité enzymatique hydroxylase. JMJD6 serait capable de former des ponts covalents entre ses extrémités N et C terminales *via* un processus

d'auto-hydroxylation (Han et al., 2012). A l'heure actuelle, aucunes données n'existent concernant la régulation de l'activité déméthylase de JMJD6. Ce sont des pistes qu'il serait intéressant de poursuivre.

Certains auteurs n'ont pas été en mesure de mettre en évidence une activité déméthylase de JMJD6 sur les histones décrits par l'équipe de R. Bruick. On peut imaginer que la préparation des protéines recombinantes GST-JMJD6 peut jouer sur l'activité de l'enzyme. De plus, la plupart des auteurs ont démontré que JMJD6 ne déméthyle pas l'histone H4 diméthylée symétriquement sur l'arginine 3 (Boeckel et al., 2011; Webby et al., 2009). Or, nous n'avons pas non plus, grâce à un anticorps général reconnaissant les diméthylations symétriques, pu mettre en évidence une diminution de la diméthylation symétrique dans les lignées inhibées pour JMJD6.

Par contre, il a été bien caractérisé que JMJD6 ne catalyse pas la déméthylation des lysines méthylées (Hahn et al., 2010). Nous n'avons pas non plus réussi à déméthylé ER α préalablement méthylé sur sa lysine 302.

Afin d'identifier de nouveaux partenaires de JMJD6, nous avons entrepris une étude par spectrométrie de masse. La plupart des protéines identifiées sont des protéines de liaison à l'ARN, impliquées dans son « processing ». Ces données sont en adéquation avec les données bibliographiques. En effet, JMJD6 a la capacité d'interagir avec l'ARN simple brin et le modifier (Hong et al., 2010). De plus, JMJD6 interagit avec U2AF65 et régule ainsi l'épissage alternatif (Boeckel et al., 2011; Webby et al., 2009). De manière tout à fait intéressante, 23 protéines sur 25 ont été identifiées méthylées sur résidus arginines. Cela confirme l'idée que JMJD6 régule la diméthylation asymétrique. Il reste à déterminer si JMJD6 peut aussi réguler la diméthylation symétrique. Pour l'instant, l'étude de la diméthylation symétrique sur les lignées inhibées pour JMJD6, et les données bibliographiques ne vont pas en ce sens (Boeckel et al., 2011; Webby et al., 2009).

En résumé ce travail a permis de mettre en évidence un nouveau substrat de JMJD6, ER α . Nous avons démontré que JMJD6 déméthyle ER α permettant ainsi la régulation du complexe mER α /Src/PI3K et favorisant sa fine régulation.

IV- Résultats complémentaires

En collaboration avec Elisabetta Marangoni et Paul Cottu de l'Institut Curie à Paris, notre équipe a débuté une étude préclinique dans l'objectif *in fine* est de tester des combinaisons thérapeutiques. Leur équipe a établi des modèles de xénogreffes de tumeurs du sein humaines chez des souris immunodéficientes. Directement après la chirurgie, les tumeurs sont découpées en petites pièces qui sont greffées en sous-cutané dans une glande mammaire au niveau du cou des souris. Cette position est optimale pour la prise tumorale. Depuis 10 ans, 700 tumeurs ont été greffées et 60 modèles de xénogreffes ont été établis regroupant les différents types de tumeurs mammaires humaines (luminale, HER2+, triples négatives). Toutefois, tous les modèles ne présentent pas la même prise. Les tumeurs humaines les plus agressives (triples négatives) sont les tumeurs dont le taux d'expression est le plus fort. De ce fait, moins de 5% de tumeurs hormono-dépendantes ont été greffées avec succès. Tous ces modèles de xénogreffes conservent le profil global de la tumeur de patientes correspondantes et restent stables après plusieurs plusieurs réimplantations (Marangoni et al., 2007; Reyat et al., 2012). La première étape de ce travail a été de cribler les différents modèles de xénogreffes pour l'expression du complexe mER α /Src/PI3K. Pour cela, nous avons étudié les interactions ER α /Src et ER α /PI3K en Duolink.

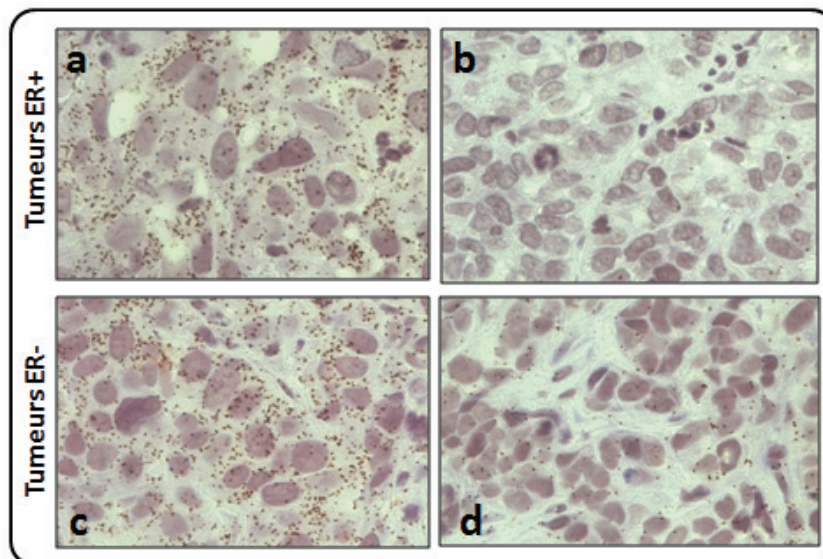


Figure 50 : Analyse de l'interaction ER α /Src sur des xénogreffes de tumeurs de sein humaines en Duolink

Les photos correspondent à deux xénogreffes de tumeurs ER α + (a, b) et à deux xénogreffes de tumeurs ER α - (c, d).

Avec ce crible, nous avons identifié certaines xénogreffes positives pour l'expression du complexe ER α /Src (**Figure 50, panel a, c**) et d'autres au contraire négatives (**Figure 50, panel b, d**).

d), et ceci dans des tumeurs ER α positives ou ER α négatives. Nous obtenons le même type de résultats pour le couple ER α /PI3K.

Le fait de retrouver des modèles de souris dans lesquelles on a une hyperactivation du complexe, de façon similaire aux tumeurs humaines, présente un intérêt fondamental dans l'étude des voies non génomiques. Nous avons pour objectif, sur les xénogreffes exprimant fortement le complexe ER α /Src/PI3K que ce soit (i) sur les modèles triples négatives, ou (ii) sur les modèles hormono-sensibles, de tester différentes drogues. Ces modèles précliniques sont essentiels avant tout essais thérapeutiques.

(i) Nous avons observé dans des tumeurs humaines ER α négatives une hyperactivation du complexe ER α /Src/PI3K. Ces modèles de xénogreffes ER α -, dans lesquelles nous observons le même mécanisme, feront donc partis d'un axe de travail pour des tests de drogues.

(ii) Les modèles hormono-sensibles présentent deux intérêts majeurs.

Nous allons comme en (i) pouvoir tester différentes combinaisons de drogues associées ou non au tamoxifène, la thérapie majeure pour le traitement des tumeurs ER α +

De plus, ces modèles vont nous permettre d'étudier les mécanismes de résistance aux thérapies ciblées. A partir de ces modèles de xénogreffes ER α +, des modèles résistants au tamoxifène ont été obtenus à partir de tumeurs hormono-sensibles. Dans ces modèles nous avons étudié la formation du complexe grâce à l'analyse des interactions ER α /Src et ER α /PI3K. En comparaison à la xénogreffe hormonosensible, on observe une augmentation significative du nombre de points par cellule dans la lignée correspondante résistante au tamoxifène (**Figure 51**). Des modèles de xénogreffes résistantes à l'évérolimus et au fulvestrant sont en cours d'obtention. Le même travail pourra alors être réalisé.

Sur les modèles résistants au tamoxifène précédemment décrits, pour une autre étude, nos collaborateurs ont réalisé plusieurs combinaisons de traitements. Nous avons eu accès aux blocs de tumeurs correspondantes et avons réalisé des expériences de Duolink (ER α /Src et ER α /PI3K). En comparaison à la xénogreffe résistante au tamoxifène, un traitement au fulvestrant ou une combinaison fulvestrant plus everolimus (RAD) diminue significativement le nombre d'interaction (**Figure 52**). Ces résultats sont attendus puisque le fulvestrant a la propriété de dégrader ER α . Le traitement des tumeurs au tamoxifène ou à l'évérolimus seul ne diminue pas significativement le nombre de points, tandis que la combinaison du tamoxifène avec l'évérolimus diminue la formation du complexe (**Figure 52**). De plus, dans ces tumeurs on observe une diminution de la taille tumorale. Cette combinaison thérapeutique semble prometteuse. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature. En effet, un essai clinique de phase II coordonné au Centre Léon Bérard a préalablement montré que le tamoxifène combiné avec l'everolimus peut réverser la résistance hormonale chez des femmes ménopausées présentant une résistance aux anti-aromatases (Bachelot et al., 2012). Cependant aucune étude moléculaire n'a permis d'expliquer cela. Il reste donc encore à comprendre les mécanismes à l'origine de la diminution de la formation du complexe lorsque l'on combine l'everolimus et le

tamoxifène alors que seules ces deux drogues n'entraînent pas de diminution significative du complexe. Ces modèles de xénogreffes, en plus des lignées cellulaires de tumeurs mammaires résistantes aux thérapies, sont d'excellents modèles pour mieux appréhender ces mécanismes.

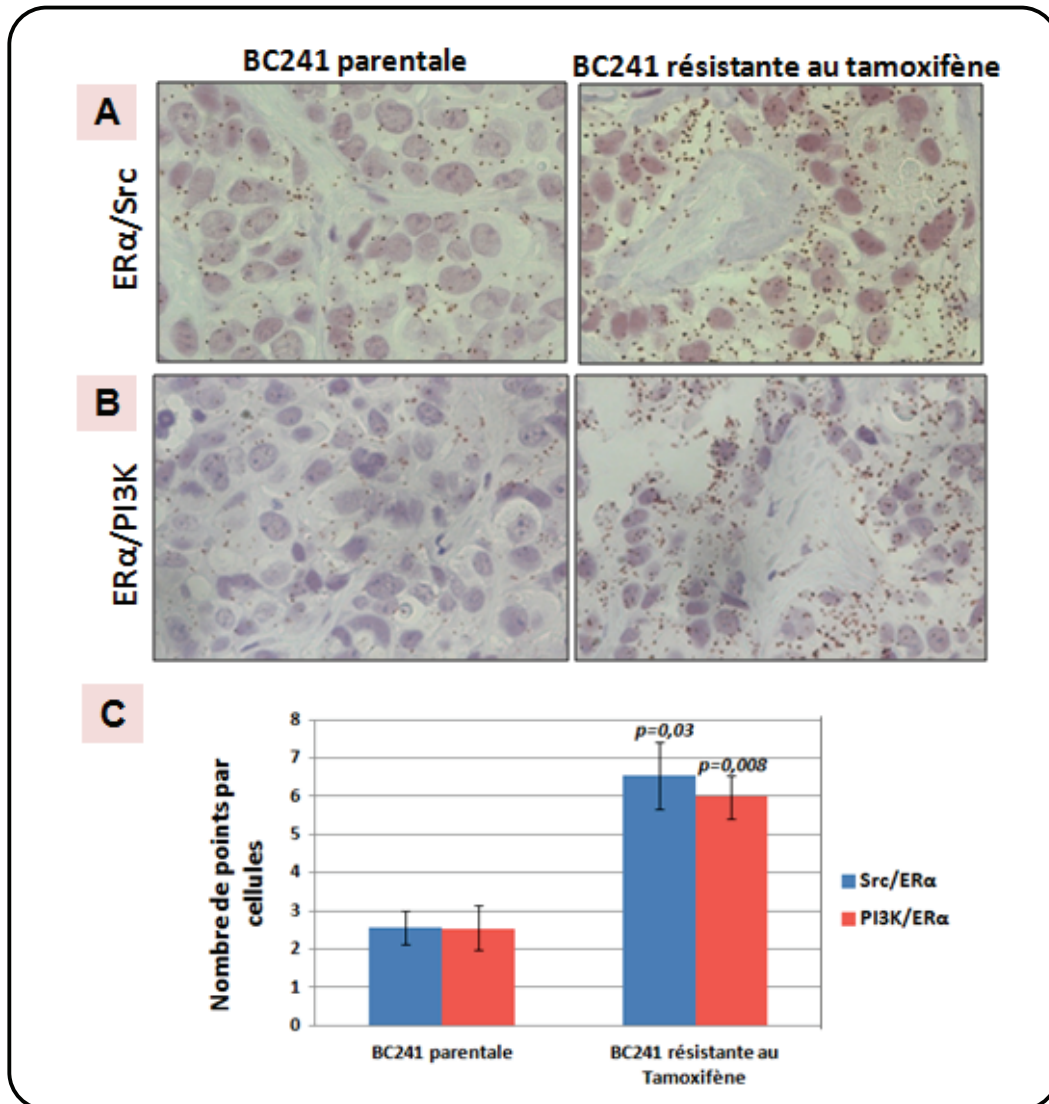


Figure 51 : Etude du complexe ERα/Src/PI3K dans un modèle de xénogrefe résistant au tamoxifène.

A : Interaction ERα/Src. **B :** Interaction ERα/PI3K. **C :** Comptage du nombre de points par cellules tumorales. Les p-values ont été déterminées par un t-test de Student.

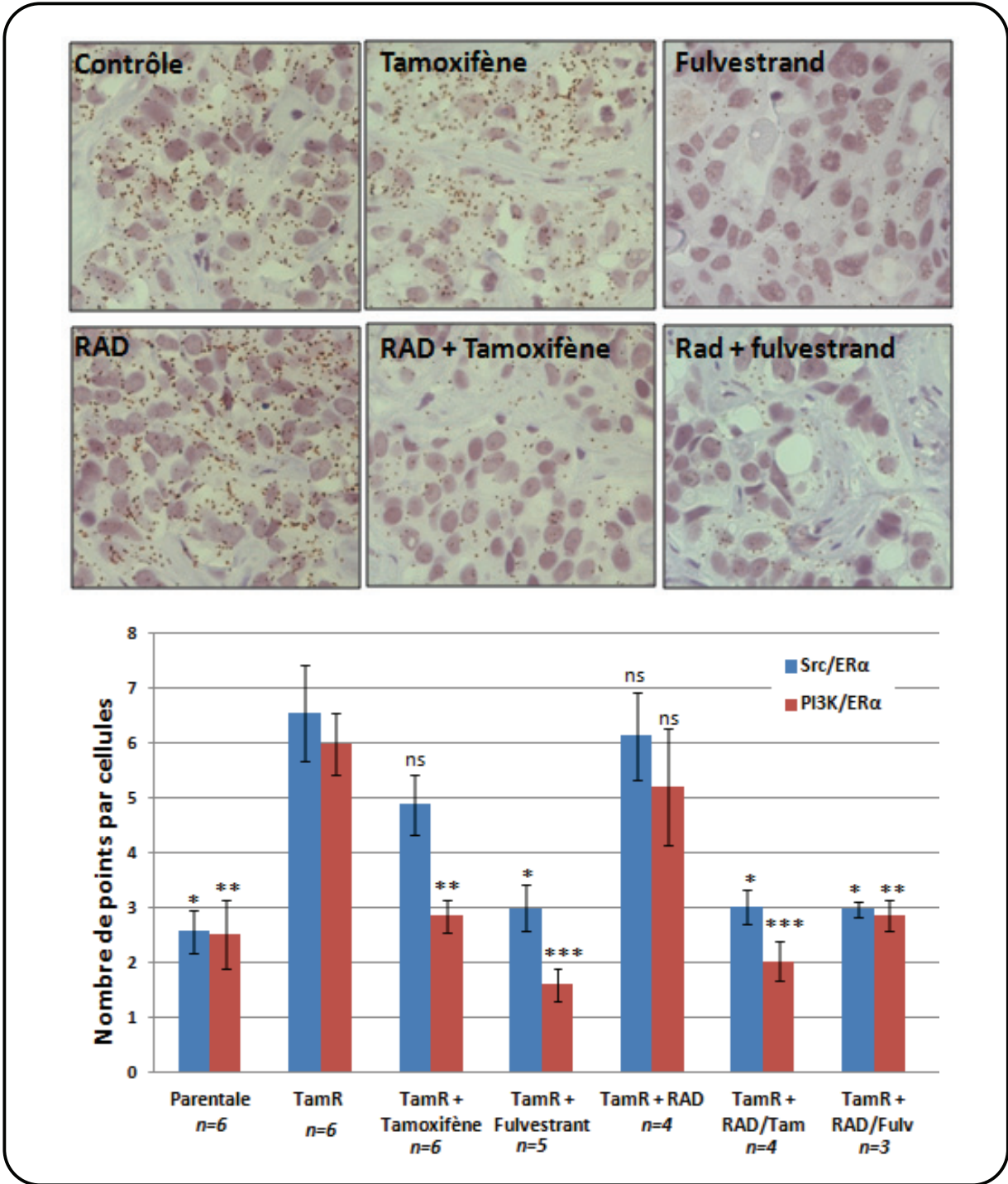


Figure 52 : Etude de l'interaction ERα/Src dans le modèle résistant au tamoxifène après traitements.

Les p-values ont été déterminées par un t-test de Student. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

C- Discussion générale et perspectives

Dans un premier temps, nous avons démontré que les voies non génomiques des œstrogènes existent *in vivo*. La méthylation de ER α est corrélée à la formation du complexe ER α /Src/PI3K dans le tissu mammaire et ce complexe est dérégulé dans les tumeurs. Plus précisément, sur une cohorte de 175 tumeurs, nous avons montré que 55% des tumeurs présentent une surexpression du complexe. Une forte expression de ce complexe est un marqueur indépendant de mauvais pronostic, associée à une diminution de la survie sans progression. De plus, nous avons démontré que ces voies de signalisation non génomiques sont actives *in vivo* puisque nous observons une corrélation entre la surexpression du complexe mER α /Src/PI3K et l'activation d'AKT, mais aussi de 4EBP1 et S6K1, deux protéines *en aval* de la voie de signalisation AKT qui stimulent directement la synthèse protéique. Cette activation est médiée par la phosphorylation des protéines et a été visualisée en immunohistochimie.

De plus, nous avons identifié la protéine LKB1 comme nouveau partenaire du complexe mER α /Src/PI3K. LKB1 est une protéine sérine/thréonine kinase qui possède des propriétés onco-suppressives et sa perte d'expression est associée à la tumorigenèse. Or de façon surprenante, l'étude de son expression par IHC dans une cohorte de tumeurs mammaires a montré une dualité fonctionnelle selon sa localisation subcellulaire. En effet, sa forte expression nucléaire est un facteur de bon pronostic alors que sa forte expression cytoplasmique est un facteur de mauvais pronostic.

Un autre partenaire de ER α méthylé que ce travail a mis en évidence est JMJD6, la seule et unique arginine déméthylase décrite à ce jour. JMJD6 s'associerait à ER α méthylé lorsque le complexe mER α /Src/PI3K est formé et permettrait ainsi la déméthylation de ER α , et la dissociation du complexe mER α /Src/PI3K.

Ces résultats ont permis une meilleure compréhension des voies non génomiques et de la régulation de la méthylation de ER α . Ils nous permettent de proposer un modèle général dans lequel le macrocomplexe mER α /Src/PI3K active les voies de signalisation non génomiques après stimulation œstrogénique (**Figure 53**). Cela conduit à l'activation d'AKT ainsi que de p-4EBP1 et p-S6K1 *via* la voie AKT/mTor. De plus, dans le cytoplasme, LKB1 peut s'associer au complexe mER α /Src/PI3K. Lorsque LKB1 est fonctionnelle, elle régule négativement la voie mTOR, ce qui induit l'inhibition de la phosphorylation de ses substrats : p-S6K et p-4EBP1. Dans les tumeurs mammaires dans lesquelles ER α est hyperméthylé, la protéine LKB1 serait séquestrée dans le complexe mER α /Src/PI3K, ne pouvant plus exercer son rôle inhibiteur sur la voie de signalisation Akt/mTor (**Figure 53**). Cela nous a été confirmé par le fait que nous observons une hyperphosphorylation de 4EBP1 dans les tumeurs présentant une forte expression de LKB1 associé au complexe mER α /Src/PI3K. Il serait intéressant de séquencer LKB1 dans les tumeurs mammaires humaines afin de vérifier que la protéine LKB1 associée au complexe n'est pas mutée. De plus, JMJD6 déméthyle ER α , permettant la dissociation du complexe dans un état physiologique. Cependant, dans les tumeurs mammaires présentant une hyperméthylation et une forte expression du complexe, JMJD6 n'exercerait plus son rôle de déméthylase (**Figure 53**).

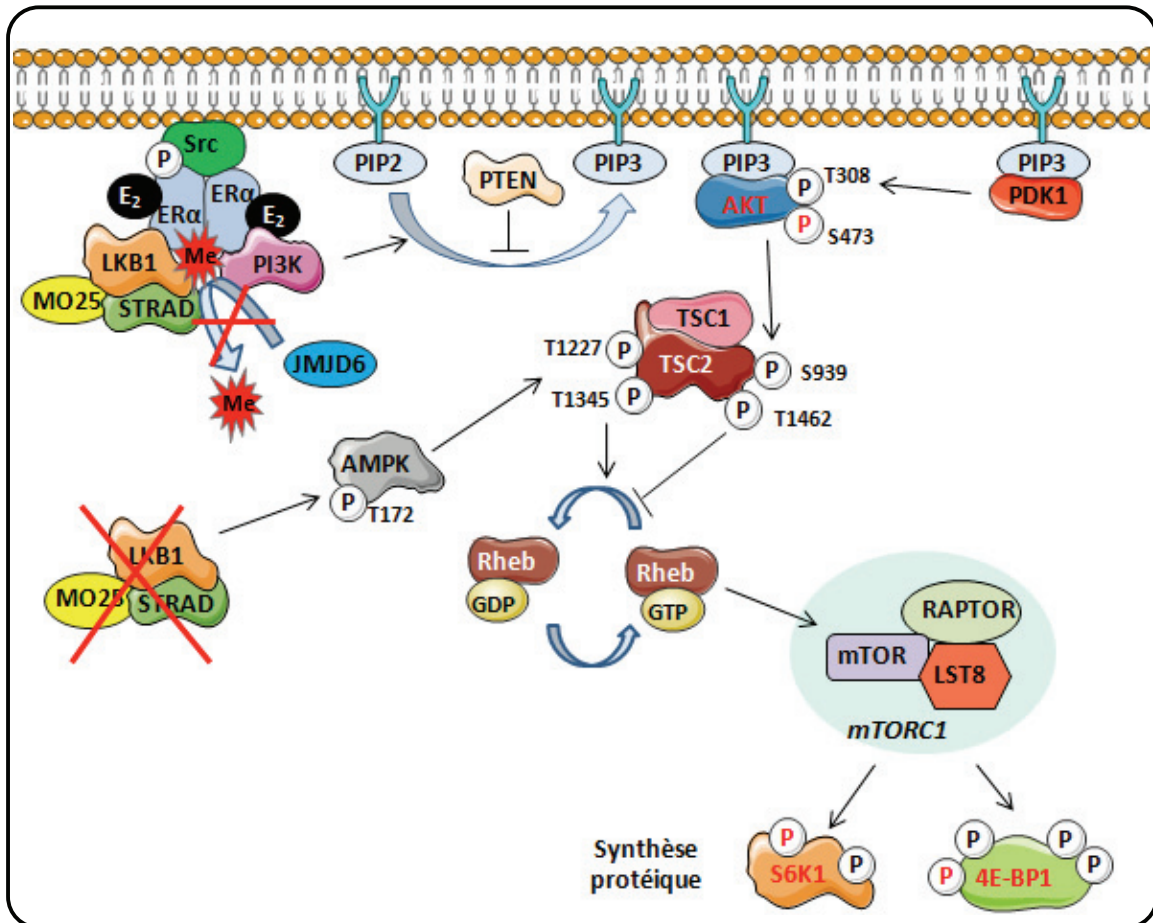


Figure 53 : Modèle intégratif de la signalisation non génomiques œstrogéno-dépendantes dans les cellules tumorales

Dans 55% des tumeurs mammaires, ERα hyperméthylé (Me) est associé à Src et PI3K. Ce macrocomplexe active AKT par phosphorylation. Cela stimule la voie AKT/mTor conduisant à l'activation de 4EBP1 et S6K1. Les phosphorylations que nous avons étudié et corrélé à la formation du complexe sont visualisées en rouge sur le schéma. LKB1 est quant à elle séquestrée dans le complexe des voies non génomiques et n'exerce plus son effet tampon sur la voie AKT/mTor. De même, JMJD6 n'exercerait plus son activité déméthylase. ERα est alors hyperméthylée et il n'y a plus de dissociation du complexe mERα/Src/PI3K.

Du fait de son rôle suppresseur de tumeurs, nous pouvions nous attendre à une diminution de l'expression de LKB1 dans les tumeurs de mauvais pronostic. Toutefois, nous observons le phénomène inverse. Cela reflète la dualité fonctionnelle des protéines. Il existe une balance entre les activités onco-suppressives et pro-oncogéniques. La fine régulation des protéines, par des modifications post-traductionnelles ou d'autres mécanismes, permet un équilibre des activités protéiques. Une inhibition ou une surexpression de ces protéines conduisent alors à un défaut de signalisation. Dans le cas de LKB1, on suppose que le complexe mERα/Src/PI3K trappe LKB1 associée à ses partenaires Mo25 et STRAD dans le cytoplasme l'empêchant ainsi de phosphoryler ses substrats et d'agir en tant que suppresseur de tumeurs.

Toutes ces données apportent la preuve que les différents acteurs de cette signalisation (ER α , Src, PI3K, AKT, JMJD6, LKB1...) peuvent constituer des éléments clés au diagnostic mais également lors de la décision thérapeutique et peut-être aussi constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces travaux ont donné lieu à une étude préclinique grâce à une collaboration avec l'Institut Curie à Paris. Nous avons pu montrer que les voies de signalisation non génomiques des œstrogènes sont activées dans certaines xénogreffes issues de tumeurs mammaires humaines, et elles peuvent constituer de bons modèles précliniques afin de tester des combinaisons thérapeutiques. En effet, j'ai commencé à étudier l'activation de la voie de signalisation non génomique dans ces xénogreffes *via* l'interaction entre ER α /Src et ER α /PI3K par la technologie du Duolink. Ensuite, les souris portant ces xénogreffes qui présentent une hyperactivation de la voie de signalisation pourront être traitées soit par hormonothérapie classique, soit par hormonothérapie couplée à un inhibiteur de Src ou de la voie mTor. A la suite de cela, un essai thérapeutique est envisagé. Au diagnostic, les patientes présentant une hyperactivation de cette voie seraient stratifiées en deux catégories, (i) une partie seraient traitées par hormonothérapie classique et (ii) les autres seraient traitées par la combinaison thérapeutique validée lors de l'essai préclinique.

Ce projet est tout à fait innovant en Cancérologie. A l'heure actuelle, seules les voies génomiques sont prises en compte au diagnostic. En effet, seules les patientes exprimant ER α dans le noyau sont traitées par hormonothérapie. Elles représentent environ 70% des patientes atteintes de cancer du sein. Parmi les 30% restantes, 15% sont HER-2 positives et peuvent être traitées par thérapies ciblées (trastuzumab ou lapatinib). Cependant, les tumeurs mammaires restantes (15%) sont des tumeurs triples négatives, c'est-à-dire qu'elles n'expriment ni ER α , ni PR, ni HER-2. Aucune thérapie ciblée n'existe pour traiter ces patientes et leur pronostic de survie est très faible. Il semble donc important de déterminer les voies de signalisation qui sont activées dans ces tumeurs, afin de les cibler. De façon très intéressante, l'analyse de la survie des patientes en ne tenant compte que de l'intensité du marquage des expériences de Duolink (0, 1-2) a permis d'identifier une sous-population de patientes ER α négatives qui n'expriment pas les voies non génomiques et qui ne rechutent pas. De plus, nos données ont permis de montrer que 53% des tumeurs ER α négatives expriment le complexe mER α /Src/PI3K. Cela suggère que les voies non génomiques œstrogéno-dépendantes pourraient aussi devenir une nouvelle cible thérapeutique dans les tumeurs ER α négatives où très peu de traitements existent.

Une autre question qui reste en suspend concernant les voies non génomiques, est l'implication de la méthylation de ER α dans les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie. La collaboration avec l'institut Curie a permis d'apporter des informations sur ce point. En effet, sur un des modèles de xénogreffes issus de tumeurs ER α positives hormonosensibles, un modèle de tumeur résistante au tamoxifène a été établie. Nous avons montré que la tumeur

résistante au tamoxifène présente une augmentation significative de l'interaction entre ER α /Src et ER α /PI3K, suggérant l'implication des voies non génomiques dans les mécanismes de résistance au tamoxifène. De plus, lorsque ces souris ont été traitées par différents inhibiteurs et combinaisons d'inhibiteurs, nous avons montré que la combinaison du tamoxifène avec l'éverolimus permet de diminuer significativement le nombre d'interaction entre ER α /Src et ER α /PI3K. La combinaison tamoxifène et everolimus pourrait constituer une piste de thérapie intéressante dans l'essai clinique. Des données préliminaires montrent qu'il existe une augmentation de l'expression du complexe dans des lignées cellulaires résistantes au tamoxifène. Ces modèles pourraient être très intéressants pour étudier les effecteurs de la voie de signalisation ciblée par les différents inhibiteurs, et ainsi apporter une compréhension moléculaire aux données phénotypiques.

Une autre observation conforte l'implication des voies non génomiques dans la résistance à l'hormonothérapie. En général, on observe une récurrence dans les deux premières années de traitements lorsque les patientes sont résistantes au tamoxifène. L'analyse de la survie sans progression des marqueurs ER α /Src, ER α /PI3K en Duolink, ainsi que LKB1 en immunohistochimie indique une très forte chute de la survie sans progression dans les tumeurs qui expriment fortement ces marqueurs dans les 2 à 3 premières années. Cela s'ajoute aux données obtenues dans le modèle de xénogreffes résistantes au tamoxifène.

D'un point de vue mécanistique, il serait très intéressant de distinguer les effets physiologiques des voies non génomiques par rapport aux voies génomiques. Dans l'équipe, en collaboration avec le Dr P. Chambon et le Dr A. Krust, nous avons généré un modèle murin possédant une mutation de l'arginine 264 (équivalente de R260 humain) en alanine exprimant ainsi une protéine ER α non méthylable. Ce modèle nous permettra à terme d'étudier dans un modèle murin *in vivo* si la formation du complexe ER α /Src et ER α /PI3K a lieu lorsque la méthylation ne peut avoir lieu. De même, le croisement de ces souris avec un modèle de souris MMTV-Neu/Wap p53 qui développent spontanément des tumeurs au bout de 6 à 10 mois, permettra d'étudier le rôle de la méthylation de ER α dans le développement tumoral mammaire. En effet, nous avons démontré que ER α est hyperméthylée dans des tumeurs mammaires, mais n'avons pas apporté d'informations quant à la question de savoir si la méthylation est une cause ou conséquence du développement tumoral. Ce croisement murin pourra nous permettre d'étudier ce concept. Dans le modèle murin R260A, il sera aussi intéressant d'analyser les fonctions liées à ER α , afin de discriminer les effets physiologiques médiés par les voies génomiques de ceux médiés par les voies non génomiques.

Enfin, nous avons montré dans des lignées cellulaires que la méthylation est vraiment un processus clé à la formation du complexe mER α /Src/PI3K. En effet, dans certaines lignées cellulaires (T47D, BT474, Cama-1 et MDA-MB-361), on n'observe pas la méthylation de ER α , ni la formation du complexe mER α /Src/PI3K. De même, LKB1 et JMJD6 n'interagissent pas avec ER α . Pourtant ER α , PRMT1, Src et PI3K sont exprimées. Dans les lignées MCF-7, ZR-75 et CLB-Sav, ces mêmes protéines sont exprimées, et après stimulation œstrogénique, ER α est méthylé

et le macrocomplexe mER α /Src/PI3K se forme. La différence pourrait s'expliquer par des mutations de PI3K. Le séquençage des lignées T47D, BT474 et MDA-MB-361 a permis d'identifier des mutations du domaine catalytique de la PI3K dans ces trois lignées. Cette mutation ne peut pas expliquer à elle seule la différence entre les deux types de lignées puisque les cellules Cama-1 ne présentent pas de mutations de la PI3K, pourtant la méthylation n'a pas lieu.

Mon travail de thèse a permis de mieux comprendre la régulation des voies non génomiques de ER α autour de la méthylation du récepteur. Ces travaux ont permis de montrer que ces voies de signalisation existent et pourraient être des éléments clés au diagnostic mais également lors de la décision thérapeutique, puisque nous connaissons des drogues qui peuvent cibler cette voie de signalisation. Pour le moment ces voies de signalisation ne sont pas prises en compte pour le traitement du cancer du sein, mais il est à espérer que cela change dans les années à venir.

Annexes

A - Revue 1

Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors

Le Romancer M, **Poulard C**, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L.

Revue publiée dans Endocrine Reviews en Octobre 2011.

Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors

Muriel Le Romancer, Coralie Poulard, Pascale Cohen, Stéphanie Sentis, Jack-Michel Renoir, and Laura Corbo

Université de Lyon (M.L.R., C.P., P.C., S.S., L.C.), F-69000 Lyon, France; Université Lyon 1 (M.L.R., C.P., P.C., S.S., L.C.), F-69000, Lyon, France; Université Lyon 1 (P.C., S.S.), Institut des Sciences Pharmacologiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie de Lyon, F-69000 Lyon, France; Equipe Labellisée 'La Ligue' (M.L.R., C.P., P.C., S.S., L.C.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 1052, Centre de recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France; Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5286 (M.L.R., C.P., P.C., S.S., L.C.), Centre de recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France; Centre Léon Bérard (M.L.R., C.P., P.C., S.S., L.C.), F-69000, Lyon, France; INSERM Unité 749 (J.-M.R.), Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France; and Université Paris-Sud (J.-M.R.), Orsay, F-91405, France

Estrogen signaling pathways, because of their central role in regulating the growth and survival of breast tumor cells, have been identified as suitable and efficient targets for cancer therapies. Agents blocking estrogen activity are already widely used clinically, and many new molecules have entered clinical trials, but intrinsic or acquired resistance to treatment limits their efficacy. The basic molecular studies underlying estrogen signaling have defined the critical role of estrogen receptors (ER) in many aspects of breast tumorigenesis. However, important knowledge gaps remain about the role of posttranslational modifications (PTM) of ER in initiation and progression of breast carcinogenesis. Whereas major attention has been focused on the phosphorylation of ER, many other PTM (such as acetylation, ubiquitination, sumoylation, methylation, and palmitoylation) have been identified as events modifying ER expression and stability, subcellular localization, and sensitivity to hormonal response. This article will provide an overview of the current and emerging knowledge on ER PTM, with a particular focus on their deregulation in breast cancer. We also discuss their clinical relevance and the functional relationship between PTM. A thorough understanding of the complete picture of these modifications in ER carcinogenesis might not only open new avenues for identifying new markers for prognosis or prediction of response to endocrine therapy but also could promote the development of novel therapeutic strategies. (*Endocrine Reviews* 32: 597–622, 2011)

- I. Introduction
- II. Biology of Estrogen Receptors and Breast Cancer
 - A. ER α and ER β subtypes
 - B. Genomic action of ER
 - C. Nongenomic action of ER
 - D. Endocrine therapies in breast cancer
- III. Posttranslational Modifications of Estrogen Receptors
 - A. PTM involved in ER genomic signaling
 - B. PTM involved in ER nongenomic signaling
 - C. Molecular events affecting ER PTM
 - D. ER PTM deregulated in breast cancer
- IV. Discussion
- V. Future Directions

I. Introduction

The steroid hormone estrogens play a critical role in various target tissues, including the reproductive tract and the central nervous, vascular, and skeletal sys-

tems, as well as in normal mammary gland development (1). This effect is mediated by two receptors, estrogen receptor (ER) α and ER β , which function in the nucleus as ligand-dependent transcription factors. ER α is responsible for many of the effects of estrogens on normal and malignant breast tissues. Lifetime exposure to 17 β -estradiol (E₂) or estrogenic compounds constitutes a major risk factor for breast cancer development (2), through either transcriptional regulation (genomic action) (3) or involvement in membrane and cytoplasmic signaling cascades (nongenomic action) (4). In normal breast, only 10 to 20%

Abbreviations: AF-1, Activation function; AF-2, transactivation function; AI, aromatase inhibitor; AP-1, activator protein-1; CBP, CREB binding protein; Cdk, cyclin-dependent kinase; DBD, DNA-binding domain; E₂, 17 β -estradiol; E6-AP, E6-associated protein; EGF, epidermal growth factor; EGFR, EGF receptor; ER, estrogen receptor; ERE, estrogen response element; GSK3, glycogen synthase kinase-3; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; hER, human ER; IKK, I κ B kinase; LBD, ligand-binding domain; LMP2, low molecular mass polypeptide 2; mER, mouse ER; PAK1, serine/threonine p21-activated kinase; PAT, palmitoyl acyltransferase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKA, protein kinase A; PRMT1, protein arginine methyltransferase 1; PTM, posttranslational modification; RSK, ribosomal S6 kinase; SDF-1, stromal cell-derived factor-1; SERD, selective ER down-regulator; SERM, selective ER modulator; SRC, steroid receptor coactivator; SUMO, small ubiquitin-related modifier.

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/er.2010-0016 Received August 4, 2010. Accepted May 12, 2011.
First Published Online June 15, 2011

of epithelial cells express ER α (5), but ER α -null mice only develop a rudimentary mammary gland, indicating that ER α expression is essential to mammary development (1). By contrast, the mammary glands of ER β -null mice develop normally (1). Interestingly, in breast cells, ER β seems to act as an antagonist of ER α activity, impairing the ability of estrogen to stimulate proliferation (6–8). Thus, ER β may play a protective role in breast tumors by inhibiting proliferation and invasion (9–11).

There is compelling clinical and experimental evidence that sustained exposure to estrogens increases the breast cancer risk and promotes cancer progression by stimulating malignant cell proliferation (12). Although in the normal breast ER α and ER β are expressed at low levels (13), 70% of breast cancers are ER α positive, underpinning the use of agents that suppress receptor function (antiestrogens) or estrogen synthesis (aromatase inhibitors) in breast cancer treatment (14). ER α is a well-established predictive marker for hormone sensitivity and a good prognostic marker in breast cancer; it helps identify tumors that are likely to respond to endocrine treatment. Unfortunately, about 40 to 50% of the women receiving endocrine therapy fail to respond (*de novo* resistance) or become resistant (acquired resistance) to the treatment (15). A focus on estrogen signaling could help understand its deregulations in patients prone to develop resistance to endocrine therapy. Cellular responses to estrogens are complex and highly controlled. They involve the regulation of ER functions through coactivators that stabilize ER binding to DNA, thus promoting gene transcription (genomic action) and the direct activation of signaling cascades (nongenomic action).

Further levels of complexity are added by the fact that several isoforms have been identified for each receptor (16), as well as mutations (17, 18) and numerous post-translational modifications (PTM) (19) that regulate their function by influencing a number of interactions with other proteins including cytoplasmic signaling molecules (20). In addition to the long-known phosphorylation of ER α , other covalent additions such as acetylation, ubiquitination, sumoylation, and methylation have been recently described. The complexity of ER regulation is a rapidly growing issue because new PTM are continuously being identified. Reviews focusing on ER phosphorylation (21, 22) or acetylation (23) have been published, but there is a real need for more recent updated information about other ER-targeting PTM. The aim of this article is to summarize current and emerging knowledge on ER PTM, particularly on those that are deregulated in breast tumors; this could help to identify new prognostic biomarkers or biomarkers predictive of response to endocrine therapy and/or to circumvent endocrine-resistant tumor growth.

II. Biology of Estrogen Receptors and Breast Cancer

A. ER α and ER β subtypes

ER belong to the superfamily of ligand-activated transcription factors (24). There are two known ER isoforms, ER α and ER β . They arise from separate genes located on different chromosomes, but they share a high degree of overall homology, especially in their DNA binding domain (25), whereas they display different physiological functions. Like other members of this class of transcription factors, ER proteins have a characteristic modular structure. They are organized into five main domains: an N-terminal A/B region bearing the ligand-independent activation function (AF-1), a DNA-binding domain (DBD) composed of two zinc fingers, a hinge region containing the nuclear localization signal, and a domain E harboring the ligand-binding domain (LBD) and the ligand-dependent transactivation function (AF-2). The adjacent region F, located at the C terminus of the receptors, is a variable domain whose specific function has not yet been fully clarified (Fig. 1) (26). The classical 66-kDa ER α (27) and the 60-kDa ER β (28, 29) have similar structures in their central DNA-binding region (98% identity), whereas they largely differ in their activation domains (less than 15% homology in their N termini), suggesting that they may recruit different coactivator proteins, thereby altering their specific transcriptional effects. Moreover, even if ER β , like ER α , binds to E₂, ER β has a markedly reduced transcriptional activation partially due to the lack of AF-1 activity (30). The two receptors share little homology (53%) in their LBD (31), which accounts for the differences in their affinity for various ligands. For example, both full-length ER bind to E₂ with high affinity, but they differ in their ability to bind other natural and synthetic ligands. In particular, ER β has higher affinity for phytoestrogens like genistein, quercetin, or coumestrol than ER α (32, 33). Two distinct classes of synthetic ER ligands have been developed; by binding to ER, they give rise to distinct tissue-selective pharmacological profiles. Selective ER modulators (SERM) are a class of ER ligands, exemplified by tamoxifen and raloxifene, that inhibit AF-2 (but not AF-1)-dependent activation of ER (34). Tamoxifen acts as an antagonist in breast cells, in which ER activity is mainly dependent on AF-2, and as an agonist mimicking the action of estrogens in tissues like the uterus, where AF-1 activity is more important (35). Selective ER down-regulators (SERD), including the pure ER antagonist ICI 182,780 or Faslodex (also called fulvestrant), are antiestrogenic in all tissues (36, 37). They bind to ER α with 100-fold greater affinity than tamoxifen, thus inhibiting receptor dimerization and abrogating estrogen signaling. The development of knockout or transgenic mice with

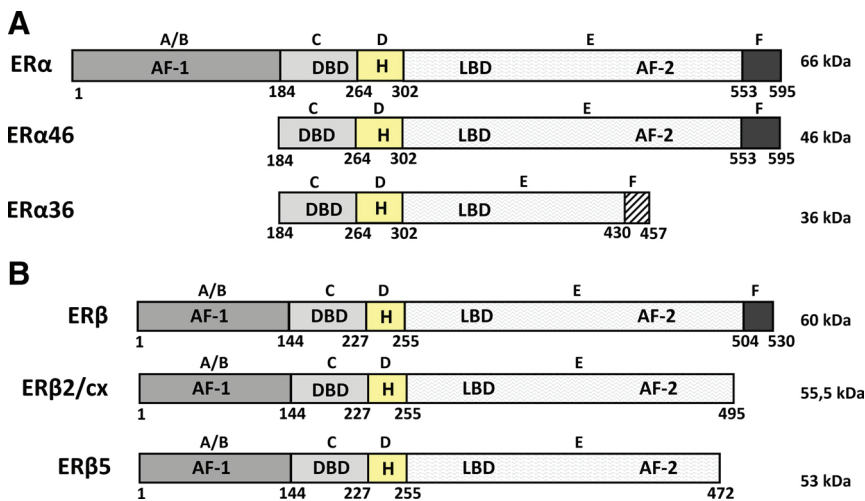


FIG. 1. Structure of ER isoforms for ER α (A) and ER β (B). ER, like other members of the nuclear receptor family, display conserved functional domains: A/B, encompassing AF-1; C, containing the DBD; D, called hinge domain contains nuclear localization signals; E, containing the LBD and AF-2; and F, the agonist/antagonist regulator. A, ER α 46, a truncated form of ER α lacking AF-1 is also shown. Another spliced variant lacking the AF-1 and AF-2 domains, ER α 36, has been cloned in breast cells. B, ER β 2/cx and ER β 5 are two spliced variants of ER β lacking the F domain.

disruptions, mutations, or overexpression of ER has increased our understanding of the relative roles and biological functions of ER α and ER β (38–41). ER α is essential for proliferation, and in contrast, ER β has an anti-proliferative role (40, 42–44). The two receptors regulate different genes in response to E₂ as well as antiestrogens (42, 43, 45). They can form heterodimers that may contribute to differences in ER-dependent gene expression (46, 47). Finally, ER β is known to inhibit both ER α -mediated transcription and E₂-induced proliferation in various cancer cells (6, 7, 48–51).

For both ER, the type of response elicited by ligand binding also depends on the cell type and on the promoters that “communicate” most of the mitogenic and survival stimuli of estrogens through direct or indirect effects on gene expression.

In addition to the classical transcripts of both receptors, numerous mRNA splice variants arising from alternative splicing or alternative promoters have been characterized. The full-length ER α 66 (named ER α in this review) is produced from an mRNA transcribed from the ER α gene that contains at least seven upstream promoters (52). The ER α 46 variant lacking the AF-1 domain (Fig. 1A) has been identified in MCF-7 breast cancer cells (53), osteoblasts (54), human macrophages (55), and endothelial cells (56). ER α 46 represses the AF-1 activity of ER α 66 (57) and inhibits the E₂-induced transcription of the *pS2* gene through recruitment of corepressors (58). In breast cell lines, this variant inhibits the action of wild-type ER in terms of both E₂ binding (59) and transcriptional response (60, 61), thus participating in endocrine resistance. The

transfection of ER α 46 in tamoxifen-resistant breast cancer cells inhibits ER α 66 responses and enhances endocrine treatment (62). However, the expression of this isoform has not been evaluated in breast tumor samples.

A 36-kDa variant (ER α 36) lacking both AF-1 and AF-2 domains has been found in breast cancer cell lines (Fig. 1A) (63). This isoform transduces membrane-initiated estrogen-dependent activation of the MAPK pathway in nongenomic E₂-mediated signaling (64, 65). Interestingly, patients who express ER α and high levels of ER α 36 are less likely to respond to tamoxifen treatment (65, 66).

In addition to ER β 1, the full-length or wild-type receptor of ER β , other variants resulting from differential splicing, namely ER β 2/cx (67, 68) and ER β 5 (25, 67, 69), have been identified

in breast tumors (Fig. 1B). Their precise role in breast cancer is still poorly understood, but their implication in various forms of resistance is strongly suspected (70).

B. Genomic action of ER

The classical model of ER activation implies that, after ligand binding, a ligand-specific conformational change of the receptor occurs, allowing its dissociation from inhibitory heat shock protein complexes and subsequent phosphorylation (71–73). These modifications trigger homo- or heterodimerization of ER and binding to specific estrogen response elements (ERE) in target genes (Fig. 2, path A). The ligand-induced conformational change of the receptor facilitates the association/dissociation of components of coregulator complexes associated with enzymatic activities that regulate chromatin function, including nucleosome remodeling, histone acetyltransferase (HAT), or methyltransferase, as well as communication with the transcriptional machinery (reviewed in Refs. 74–76) (Fig. 2, path A).

In contrast to estrogens, the binding of estrogen antagonists from the SERM group induces a distinct conformation of ER that triggers their association with corepressors like NCoR and SMRT, thereby shutting off gene transcription (77). Tamoxifen, which aims to block ER α action, has been the mainstay of hormonal therapy in both early and advanced breast cancer patients for approximately three decades (78, 79). Interestingly, tamoxifen has mixed agonist/antagonist activity and may either stimulate or antagonize ER function in tissues and genes (35). As

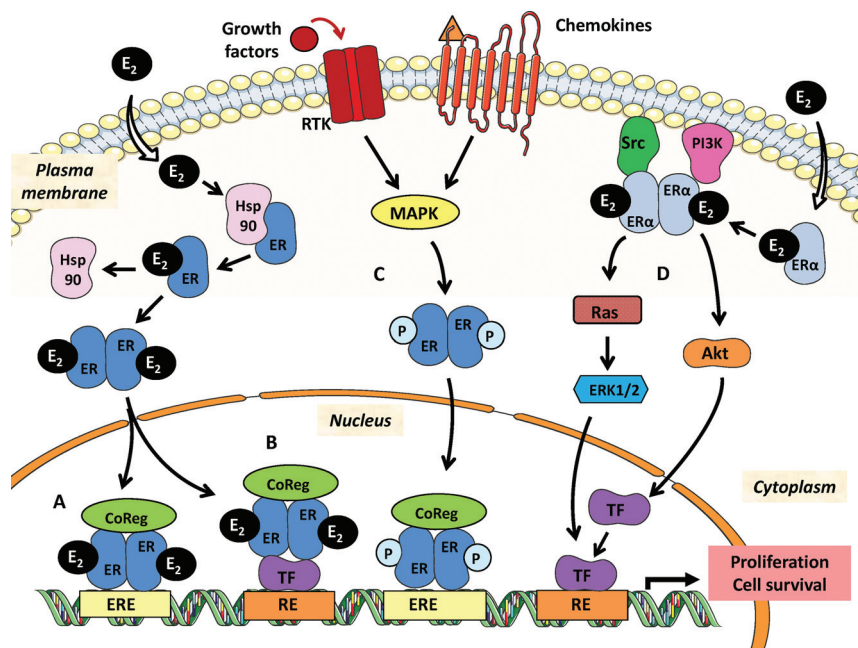


FIG. 2. ER signaling pathways. When pathways are common for ER α and ER β , we designated ER; otherwise, ER subtype is specified. Four distinct pathways of estrogen signaling through ER are shown. Pathway A is called the classical genomic pathway; E₂-bound ER dimerize and, after a change of conformation, go to the nucleus and bind ERE and recruit coactivators that will activate the transcription of target genes. Pathway B, the nonclassical genomic pathway, involves ER interactions with other transcription factors like AP-1. Pathway C is E₂-independent and activates ER through phosphorylation induced by growth factors. Pathway D, the nongenomic pathway, involves a small pool of ER located close to the membrane that, through recruitment of protein kinases (Src and PI3K), activate signaling cascades (Akt, MAPK). All of these pathways converge to cell proliferation and survival. RE, Response elements to other transcription factors; P, phosphorylation; RTK, tyrosine kinase receptor; CoReg, coregulators; TF, transcription factor; Hsp90, heat shock protein 90.

previously demonstrated, the level of expression and/or activity of coregulatory proteins can lead to alterations in ER signaling. Several studies have reported that high expression of the ER coactivator steroid receptor coactivator (SRC)-3/AIB1 (for review, see Ref. 80) in patients receiving tamoxifen adjuvant therapy is associated with poor clinical outcome, which is indicative of tamoxifen resistance (81, 82).

ER can also regulate the activity of other transcription factors through protein-protein interactions with coactivator proteins (83). Via this so-called “nonclassical” action, nuclear ER interact with specificity protein 1 (84, 85) or activator protein-1 (AP-1) (84, 86) or nuclear factor- κ B (87) through a process referred to as transcription factor cross talk (84, 86) (Fig. 2, path B). However, there is an interesting difference between ER α and ER β at AP-1 sites. In the presence of estrogens, ER α induces AP-1 driven reporter activity, whereas ER β has no effect (88). Of interest, increased AP-1 and nuclear factor- κ B transcriptional activities have been shown to be involved in endocrine resistance (89–91).

Finally, ER activities are also regulated by estrogen-independent pathways involving kinases that are activated

through growth factor receptors like epidermal growth factor receptor (EGFR) (92, 93) (Fig. 2, path C). ER β is also known to be phosphorylated by the chemokine receptor CXCR4 after its activation by binding to CXCL12/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) through Erk activation (94) (Fig. 2, path C). Very recently, this pathway has also been involved in acquired tamoxifen resistance (95).

C. Nongenomic action of ER

Estrogens also exert rapid stimulatory effects on a variety of signal transduction proteins. This pathway, largely studied for ER α , begins outside the nucleus and is independent of gene transcription. The identity of the receptors mediating this rapid signaling is still a matter of controversy (96–98). However, there is clear evidence that this activity is mediated, at least in part, by a small fraction of ER α that is localized near or at the plasma membrane (99). Dimers of ER α (100) activate multiple signal transduction cascades through direct interactions of ER with various proteins, including the tyrosine kinase Src, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and adaptor proteins (101–105) (Fig. 2, path D). ER α localization to the membrane can also be mediated by interactions with the membrane adaptor protein Shc (106) and with a variety of proximal signaling molecules such as G proteins (107). ER α interactions with Src and PI3K are also activated by other accessory proteins such as the adaptor protein p130Cas, which regulates the activation of Src kinase in T47D human breast carcinoma cells (108). Other partners may be involved, like the caveolin-binding protein striatin, which targets ER α to the plasma membrane (109). Estradiol-dependent complex formation of ER α with Src and the PI3K subunit p85 activates two major pathways: the Src/ras/MAPK and the PI3K/Akt pathways.

The activation of kinases triggers biological responses that are either dependent or independent of transcription. For example, the activation of Src and PI3K leads to increased cell proliferation (103) and abrogation of apoptosis through inactivation of the proapoptotic protein BAD via phosphorylation (110). More recently, nongenomic signaling has been shown to be associated with other cel-

ular processes. E₂ activation of PI3K/Akt signaling, for instance, inhibits the Ataxia Telangiectasia-mutated and Rad3-related kinase pathway controlling cell cycle checkpoints and DNA repair (111) and the interaction of histone deacetylase (HDAC) 6 with membrane-localized ER α , causing rapid deacetylation of tubulin that potentially contributes to cell migration and to aggressiveness of ER α -positive breast cancer cells (112). Catalano *et al.* (113) have identified another role of nongenomic estrogen signaling, namely that E₂-stimulated Src increases aromatase activity, revealing the existence of an autocrine loop between E₂ and aromatase possibly involved in breast tumorigenesis. Even if little is known on ER β nongenomic signaling, the presence of ER β at the plasma membrane suggests that it must also be involved in extra nuclear actions (114) and particularly through its association with Src (115).

For convenience, we present the genomic and nongenomic pathways separately. However, these signaling pathways are not mutually exclusive but rather complementary, with many interactions between them. The idea is that nongenomic and genomic effects may integrate a unique mode of action of estrogens in which the nongenomic signaling pathways converge for transcriptional regulation (116).

D. Endocrine therapies in breast cancer

Approximately 70% of all breast cancers are dependent on estrogen and on a functional ER α for growth. Hence, ER α -positive breast cancer is usually treated with hormone reduction or antiestrogens (15). Treatment approaches include the blockade of ER α activity by SERM like tamoxifen (117) or the destabilization and degradation of ER by SERD like fulvestrant (118–121). The antineoplastic effects of endocrine drugs are largely mediated by the inhibition of ER transcriptional effects on gene expression. Tamoxifen, which binds to and antagonizes ER, only blocks the transcriptional activating function AF-2 and thus only partially inactivates ER-regulated transcription (122, 123). Fulvestrant, which blocks both AF-1 and AF-2 functions, induces complete abrogation of the transcription of ER-regulated genes (36, 37). In the past two decades, tamoxifen has been the mainstay of endocrine therapy for both early and advanced breast cancers and has significantly contributed to the decrease in breast mortality (124). However, approximately 50% of patients with advanced disease do not respond to first-line treatment with tamoxifen, and almost all patients with metastases relapse and die from the disease (15). A second endocrine therapy strategy has recently emerged. It consists of reducing the production of estrogen in peripheral tissues and within the tumor using aromatase inhibitors (AI) like anastrozole, letrozole, or exemestane (125, 126). AI

inhibit tumor growth and have proven superior to tamoxifen in certain patient subsets (127).

However, whatever the endocrine treatment used, intrinsic or acquired resistance may occur. The molecular causes of endocrine resistance are multiple and not completely understood. Several mechanisms have been described, including the deregulation of ER expression and maturation, as well as the deregulation of PTM for both receptors and their cofactors. Moreover, increased Her2/NEU (Erb-B2) receptor tyrosine kinase signaling and deregulation of the cell cycle and apoptosis machineries have also largely been associated with resistance (for review, see Ref. 128).

Because only 1% of primary breast cancers carry ER α mutations (129), it seems more relevant to focus on ER signaling to elucidate the mechanisms responsible for resistance, to develop more specific biomarkers predictive of response to endocrine therapy, and to identify new therapeutic targets for endocrine-resistant disease.

III. Posttranslational Modifications of Estrogen Receptors

Because PTM are crucial to the physiological function of proteins, understanding the coding of these modifications is particularly important to elucidate the activity of a given protein.

ER and their coregulators are targets for multiple PTM (130). The synergic coupling between extranuclear and genomic actions of hormones is accompanied by highly specific PTM that serve not only as triggers but also as mediators and promoters of the signaling cascades. Deregulating both the phosphorylation cascades and the acetylation process, for example, can dramatically affect the fate of a number of factors involved in ER signaling (121, 131, 132) and impact cell survival. The development of site-specific antibodies recognizing only modified forms of ER α has greatly simplified the analysis of PTM and has led to rapid advances in mechanistic studies. More recently, mass spectrometry has facilitated the identification of additional PTM, and the catalog of ER α PTM now comprises modifications of approximately 22 sites throughout the molecule, including phosphorylation, methylation, acetylation, sumoylation, and ubiquitination. Much less information is available for ER β . Most of our understanding of ER β PTM is derived from the pioneering work of A. Tremblay and relates to phosphorylation (133). However, it seems that the phosphorylation of ER β by protein kinases varies with the type of cell, the type of promoter, and the identity of the effector.

In this section, we will focus on well-documented PTM targeting ER (less well-documented PTM are de-

scribed only in Table 1). These modifications influence ER functions, integrating genomic and rapid action, as they act on protein stability, subcellular localization, dimerization, DNA binding, and interaction with coregulators. We will also describe the known interplay between modifications as well as their deregulation in breast cancer.

All modified residues and their functional data are listed in Table 1 for ER α and in Table 2, for ER β . PTM are

also presented on ER sequences to permit visualization of the domain where the modification occurs (Fig. 3).

A. PTM involved in ER genomic signaling

1. Phosphorylation of ER α on serine

It has been known since the early 1980s that ER α is a phosphoprotein whose ligand-binding activity is enhanced by phosphorylation (134) through the activation

TABLE 1. Modified sites of human ER α and their function

| Amino acid | Modification | Activator | Enzyme involved | Function | Ref. |
|------------|-----------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|----------|
| Y52 | Phosphorylation | Ligand independent | c-Abl | Activates stability, transcription | 262 |
| S102 | Phosphorylation | Constitutive, E ₂ | GSK3 | Activates transcription | 137 |
| S104/106 | Phosphorylation | Constitutive, E ₂ | GSK3 | Activates transcription | 137 |
| | | Constitutive, E ₂ , Tam | Cyclin A-Cdk2 | Activates transcription | 138 |
| | | E ₂ , Tam, ICI, PMA | MAPK | Activates transcription | 136 |
| | | E ₂ | MAPK | Dimerization | 140 |
| S118 | Phosphorylation | E ₂ , Tam, ICI | ND | Activates transcription | 145 |
| | | EGF, IGF-I | MAPK | Activates transcription | 92, 146 |
| | | E ₂ | Cdk7 | Activates transcription | 146, 263 |
| | | ND | MAPK | Activates RNA splicing | 139 |
| | | E ₂ | GSK3 | Activates transcription | 137 |
| | | E ₂ | IKK α | Activates transcription | 147, 148 |
| | | Prolactin | ND | Activates transcription | 149 |
| | | ROS | MAPK | Down-regulation | 264 |
| | | E ₂ | MAPK | Dimerization | 140 |
| | | S154 | Phosphorylation | Constitutive, E ₂ , EGF | ND |
| S167 | Phosphorylation | Constitutive | Akt | Activates transcription | 152 |
| | | ROS | Akt | Down-regulation | 264 |
| | | EGF | p90 RSK | Activates transcription | 151 |
| | | Insulin, PMA | S6K1 | Activates transcription | 153, 154 |
| | | ND | Akt | Activates stability | 266 |
| S236 | Phosphorylation | Constitutive | PKA | Inhibits dimerization | 155 |
| Y219 | Phosphorylation | ND | c-Abl | Activates: dimerization, DNA binding, stability, and transcription | 262 |
| R260 | Methylation | E ₂ | PRMT1 | Nongenomic signalling | 227 |
| K266 | Acetylation | E ₂ | p300 | Activates transcription | 181 |
| | Sumoylation | E ₂ , Tam | SUMO-1 | Activates transcription, DNA binding, | 206 |
| K268 | Acetylation | E ₂ | p300 | Activates transcription | 181 |
| | Sumoylation | E ₂ , Tam | SUMO-1 | Activates transcription, DNA binding | 206 |
| S282 | Phosphorylation | E ₂ | CK2 | Inhibits transcription | 267 |
| S294 | Phosphorylation | E ₂ | ND | Activates transcription | 267 |
| K299 | Acetylation | Constitutive | p300 | Inhibits transcription | 182 |
| | Sumoylation | E ₂ , Tam | SUMO-1 | Activates transcription, DNA binding | 206 |
| K302 | Acetylation | Constitutive | p300 | Inhibits transcription | 182 |
| | Sumoylation | E ₂ , Tam | SUMO-1 | Activates transcription, DNA binding | 206 |
| | Ubiquitination | Constitutive, E ₂ , ICI | Ubiquitin | Proteasomal degradation | 201 |
| K303 | Methylation | Constitutive | SET7 | Activates stability | 208 |
| | Acetylation | Constitutive | p300 | Inhibits transcription | 182 |
| | Sumoylation | E ₂ , Tam | SUMO-1 | Activates transcription, DNA binding | 206 |
| | Ubiquitination | Constitutive, E ₂ , ICI | ubiquitin | Proteasomal degradation | 201 |
| S305 | Phosphorylation | ND | PAK1 | Activates transcription | 158, 160 |
| | | ND | PKA | Activates transcription | 157 |
| | | ND | Akt | Resistance to AI | 163 |
| T311 | Phosphorylation | E ₂ | p38-MAPK | Nuclear localization | 268 |
| C447 | Palmitoylation | Constitutive | PAT | Plasma membrane localization | 215 |
| Y537 | Phosphorylation | E ₂ | Calf uterine kinase | E ₂ binding | 269 |
| | | Constitutive | Src | Dimerization, DNA binding | 223, 270 |
| | | Constitutive | Src | E ₂ binding | 271 |
| | | EGF | EGFR | Proliferation | 272 |
| S559 | Phosphorylation | Constitutive | CK2 | Inhibits transcription | 267 |

ND, Not determined; ICI, ICI 172 780; PAK1, p21-activated kinase-1; PMA, phorbol myristate acetate; ROS, reactive oxygen species; Tam, tamoxifen; CK2, casein kinase 2.

TABLE 2. Modified sites of mouse ER β and their function

| Amino acid | Modification | Activator | Enzymes involved | Functions | Ref. |
|-------------|-----------------|---------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|------|
| S80 (S60) | Glycosylation | ND | ND | Inhibits ER β degradation | 169 |
| | Phosphorylation | ND | ND | Stimulates ER β degradation | 169 |
| S94 (S75) | Phosphorylation | Constitutive | MAPK | Stimulates ER β degradation | 170 |
| S106 (S87) | Phosphorylation | EGF, Ras | MAPK | Enhances the recruitment of SRC-1 | 93 |
| | | Constitutive | MAPK | Stimulates ER β degradation | 170 |
| | | CXCR4/SDF-1 | MAPK | Activates transcription | 94 |
| S124 (S105) | Phosphorylation | EGF, Ras | MAPK | Enhances the recruitment of SRC-1 | 93 |
| | | E ₂ , DPN, genistein | ND | ND | 261 |
| S255 (C399) | Phosphorylation | Erb-B2, Erb-B3 | Akt | Inhibits transcription | 173 |
| | Palmitoylation | ND | PAT | Plasma membrane localization & activation of proapoptotic cascades | 219 |
| Y507 | Phosphorylation | Constitutive | Src | Activates transcription | 174 |

Most studies have been performed using mouse transfected HA-tagged ER β ; residues in *parentheses* correspond to residues in human ER β . ND, Not determined; CXCR4, (CXC motif) receptor 4; DPN, diarylpropionitrile.

of a Ca⁺⁺-dependent calmodulin kinase (135) possibly involved in ER nuclear translocation. Although pioneer experiments were carried out with partially purified calf uterine ER α and although they caused some controversy at the time they were published, the concept of the relationship between a nuclear hormone receptor activity and its phosphorylation-dependent activation was launched.

The target residues include serine, threonine, and tyrosine; phosphorylated serines are more concentrated within the AF-1 domain, resulting in ligand-independent regulation of receptor transactivation (21). There are so many targets for phosphorylation that we have chosen to focus on the most widely analyzed residues; for the others, information can be found in Table 1.

a. S104/106. These two sites, when phosphorylated, are involved in ER α activity because acidic amino acid substitution stimulates ER α activity as strongly as S118 substitution (136). The particularity of S104/106 phosphorylation is that it is induced exclusively by estrogen and not by growth factor pathways. So far, both glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) kinases were involved in this modification (137, 138). More recently, MAPK has also been shown to phosphorylate these residues (136). Of note, the two residues are required for the agonist activity of tamoxifen, in conjunction with S118, suggesting that these sites might contribute to tamoxifen resistance in breast cancer (136).

b. S118. S118 has been the most widely studied target site and is a good example of the complexity of ER α phosphorylation. S118 has been reported to be important for the dimerization of ER α and ER α -mediated RNA splicing (139, 140). In addition, phosphorylation at this site is also important for direct binding to and activation/repression of several ER α target genes (141). S118 phosphorylation facilitates ER α interactions with coactivators such as

CREB binding protein (CBP)/p300 (142) and SRC-1 (143) and then mediates ligand-dependent as well as ligand-independent activation of the receptor (144, 145). In support of this statement, it has been documented that both estrogens and growth factors such as epidermal growth factor (EGF) and IGF-I can result in S118 phosphorylation on ER α (146). Growth factors trigger S118 phosphorylation through Ras-MAPK cascades (92). The S118A mutant is not activated by EGF because no enhancement of E₂-induced ERE reporter activity has been observed in transfected cells (144), demonstrating the independence from ligand and the phosphorylation requirement for ER α transcriptional activity. Several different kinases are responsible for the estrogen-dependent phosphorylation of S118. Cdk7 (146), I κ B kinase (IKK) α (147), and GSK3 (137) have been identified as good candidates. However, a recent study performed in MCF-7 cells using specific inhibitors has shown that IKK α , but not Cdk7, is involved in estrogen-mediated phosphorylation at S118 (148). More recently, this residue has also been shown to be phosphorylated upon prolactin treatment, but the kinase responsible remains unidentified (149). This phosphorylation is also involved in ER α -mediated RNA splicing. This effect is mediated by the binding of ER α with a component of the spliceosome complex, the splicing factor SF3a, which is dependent on the MAPK-mediated phosphorylation of ER α at S118 (139).

c. S167. S167 is a major multiregulated phosphorylated residue in ER α (150). Mutation analysis of this site has demonstrated its involvement in the transcriptional activity of the receptor (151). Its phosphorylation was previously attributed to Akt and p90RSK (p90 ribosomal S6 kinase) (151, 152), but recent convincing data have shown that S6K1 is a physiological kinase for S167 that regulates ER α transcriptional activity, thus contributing to the pro-

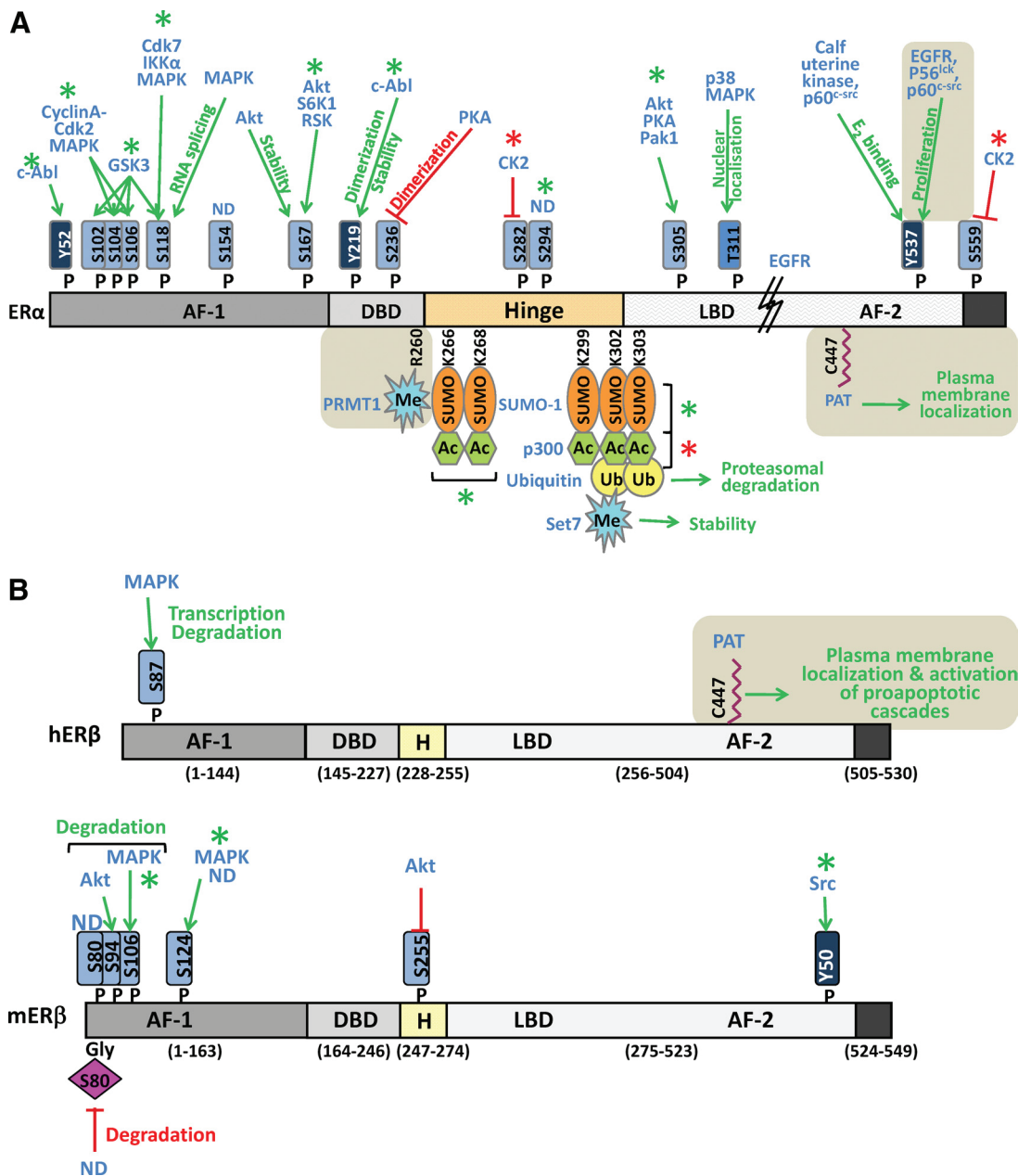


FIG. 3. Amino acids modified in ER are presented in panel A for ER α and in panel B for ER β . All modified residues and kinases implied are represented on ER sequences. A, For ER α , the hinge domain was highly modified by PTM. B, For ER β , because most of the sites have been described on the mouse receptor, we present both the human (hER β) and the mouse (mER β) isoforms. Modifications are designated as follows: Me, methylation; P, phosphorylation; Ac, acetylation; Ub, ubiquitination; Sumo, sumoylation; Gly, glycosylation. Palmitoylated sites are represented as wavy lines. Functions of modifications are presented in green for activation and red for inhibition. *, Transcription activity. PTM involved in nongenomic pathways are shaded in gray. ND, Not determined.

liferation of ER-positive breast cancer cells (153). In fact, this phosphorylation is regulated by a temporal combination of two pathways: the MAPK/RSK and the mammalian target of rapamycin 1/S6K1 pathways (154). Interestingly, pS167 is associated with tamoxifen resistance and agonist activity in endometrium cancer cells (143).

d. S236. *In vitro*, in the absence of estrogen, protein kinase A (PKA) can phosphorylate S236, located in the DNA binding domain. S236 phosphorylation participates in ER α dimerization as a mutation of serine to glutamic acid

prevents DNA binding by inhibiting dimerization. In addition, this mutation reduces E₂ and 4-hydroxy-tamoxifen activity in both the presence and absence of PKA (155). Other works have shown that S236 phosphorylation protects ER α from ligand-mediated proteasome degradation (156). This is in agreement with previous data showing that inhibition of PKA decreases ER α stability in both the presence and absence of ligands (121).

e. S305. A large body of information on S305 phosphorylation in ER α has been gathered by Michalides *et al.* (157),

who have shown that this site is phosphorylated by PKA *in vitro* and thus participates in ER α transcriptional activity. An ER α S305E mutant, mimicking constitutive phosphorylation, has been shown to increase receptor dimerization and fixation to promoters of target genes in the presence of estrogen (158). Interestingly, ER α activation at S305 is sufficient to up-regulate the expression of several ER-regulated genes like cyclin D1, a major ER-regulated gene involved in the E₂-induced progression of breast cancer (159). S305 phosphorylation and activation of ER α transcriptional activity have also been evidenced in a murine model expressing a constitutively activated serine/threonine p21-activated kinase (PAK1) (160). These mice have developed mammary gland hyperplasia, revealing a role for the PAK1-ER α pathway in promoting tumorigenesis in mammary epithelium (160). Michalides' team has shown that the down-regulation of PKA-R1 α , a negative regulator of PKA, triggers PKA hyperactivation leading to S305 phosphorylation, converting tamoxifen from an ER α inhibitor into a growth stimulator (157). These authors have also pointed out the prime importance of phosphorylation at S305 for interactions of ER α with coactivators like SRC-1 and activation of gene transcription upon tamoxifen treatment (161). Interestingly, despite its ability to induce tamoxifen resistance, pS305 ER α alone does not modify the response to another endocrine molecule like the SERD fulvestrant, and the additional overexpression of cofactors like cyclin D1 and SRC-1 is required (157).

However, recent data obtained using an antibody specific for pS305 ER α have demonstrated that in a cellular context, PKA (and not PAK1) can induce this phosphorylation (162).

Recently, Fuqua's team (163) has shown that this residue is also phosphorylated by Akt through a cross talk between the IGF-I and ER α pathways. They have also demonstrated that when the K303R ER α mutant is overexpressed in breast cancer cells, S305 is constitutively phosphorylated, leading to resistance to tamoxifen (164) but also to the AI anastrozole (163, 165).

2. Phosphorylation of ER β

Much less is known about the phosphorylation of ER β . Although the intracellular kinases involved have not yet been precisely identified, residues, mostly localized in the AF-1 domain, have been observed, whether in the presence or in the absence of ligand binding to the receptor. The modulation of several kinase activities could activate unliganded ER β -mediated transcription (166).

Contrary to the situation for ER α , for ER β most of the modified residues have been identified in the mouse re-

ceptor; the corresponding amino acids in human will be given in *parentheses*. It appears that there is a discrepancy in ER β amino acid nomenclature due to the discovery of a longer transcript at the 5' end of the molecule (166, 167).

a. S80 (S60). The phosphorylation of mouse S80 has been identified by mass spectrometry (168). The same study has reported that this site could also be modified through O-GlcNAcylation (Table 2). S80 is located in a PEST region enriched with proline, glutamine, serine and threonine, responsible for the rapid degradation of proteins, suggesting that modification of this residue could be involved in ER β stability (169). Studies using mutants of mouse ER β (mER β) S80E mimicking phosphorylation have clearly demonstrated that phosphorylation of S80 results in rapid degradation of the receptor (169).

b. S94 (S75). In mouse, phosphorylated S94 regulates the nuclear mobility of ER β through a proteasome-dependent pathway implicating the E6-associated protein (E6-AP) ubiquitin ligase (170). This observation suggests that the AF-1 domain of ER β is involved not only in E6-AP-dependent transactivation but also in ER β stability through phosphorylations via MAPK pathways.

c. S106 (S87) and S124 (S105). Both EGF and the oncogene Ras are also able to activate ER β through MAPK-directed phosphorylation of mouse S106 and S124 (corresponding to human S87 and S105), favoring the recruitment of SRC-1 and HAT CBP to the AF-1 domain (93, 171). Additionally, these two phosphorylated sites are partially responsible for the Erb-B2/Erb-B3-mediated inhibition of liganded ER signaling (172).

Finally, mouse ER β S106 has been shown to be phosphorylated by MAPK in response to CXCL12/SDF-1, the ligand of the chemokine receptor CXCR4. S106 phosphorylation leads to enhanced ER transcriptional activity and expression of ER target genes involved in cancer cell growth, including SDF-1 (94). This phosphorylation enables ER β responsiveness at AP-1 sites in an autocrine/paracrine feedback loop, even when the receptor is complexed with a SERM like tamoxifen.

Other sites have been shown to be phosphorylated (Table 2). S255 (equivalent to human S234), for instance, is phosphorylated via the PI3K/Akt pathway through the phosphorylation-dependent release of CBP (173), whereas Y507 in mouse (corresponding to human Y488) is involved in the ligand-independent activation of ER β (174), which is suppressed by antiestrogens. Mutation of this Y488 [which corresponds to Y537 for human ER α (hER α)] in arginine is involved in the ligand-independent activation of ER β (174).

Although it has been shown that inhibitors of protein phosphatases regulate ER α signaling (175, 176), little information is available regarding the identities of the ER phosphatases involved. There is only one paper describing that the serine/threonine phosphatase PP5 targets the dephosphorylation of S118 in ER α , mediating an inhibition of its transcriptional activity (177). Efforts should be made to identify more of these phosphatases and to modulate the level of phosphorylation of ER α .

3. Acetylation of ER α

Acetylation of proteins plays an important role in the regulation of their activity. In addition to histones, a broad range of other proteins, including transcription factors, are acetylated, resulting in enhanced or reduced activity (23, 178). The HAT p300/CBP has been described as a coactivator for ER α through interaction with proteins to form “enhanceosomes” or acetylation of specific lysines in the N terminus of histones (179, 180). ER α is acetylated at multiple sites because five lysines have been reported to be acetylated by p300: K266, K268, K299, K302, and K303 (181, 182) (Table 1). Interestingly, the effect of acetylation on ER α activity varies with the target lysine; acetylation of K299, K302, and K303 inhibits the transcriptional activity of the receptor (182), whereas acetylation of K266 and K268 triggers a stimulatory effect (181). Acetylation of K299, K302, and K303 is constitutive, whereas acetylation of K266 and K268 is estrogen-dependent. However, antibodies specific for acetylated lysines are not available to address the relevance of this modification *in vivo*. Little is known about the mechanisms regulating ER α acetylation, but recent data show that BRCA1 could be a potent inhibitor of ER α activity, partly through impairment of p300-mediated ER α acetylation (183). The enzyme responsible for the reversal of this modification remains to be identified, even if deacetylase sirtuin 1 has emerged as a good candidate in *in vitro* experiments (181). For ER β , no acetylation has been described so far.

Interestingly, the degradation of native ER α after HDAC inhibitor exposure of ER-positive breast cancer cells has been shown to occur through the proteasome pathway, an important tool to reduce estradiol-mediated cell growth (132, 184). On the contrary, the stability of ER β seems to be unaffected by HDAC inhibitors (185).

4. Ubiquitination of ER α

All steroid receptors are subjected to ubiquitination, and several of the enzymes involved in this PTM have been identified (19). In most cases, however, the exact site of modification is uncertain, possibly due to the instability of polyubiquitinated proteins.

It has long been known that the regulation of ER α cellular level and transcriptional activity involves the ubiquitin-26S proteasome system (118–120). Although both basal (*e.g.*, ligand-independent) and ligand-induced ER α degradations are mediated by this proteolysis pathway (121, 186), the regulation of receptor degradation at the molecular level is highly dependent upon the physiological state and nature of the cellular stimuli. Ubiquitin-dependent degradation of E₂-bound receptor is thought to be critical for promoter clearance and additional rounds of transcription (187). Distinct mechanisms are involved in the down-regulation of ER α and the promotion of lysine polyubiquitination and subsequent proteasome-mediated receptor degradation. ER α is degraded via three distinct pathways in breast cancer cells.

First, unliganded ER α is very stable, with a half-life of up to 5 d (188), and it is targeted for degradation by dynamic interactions with heat-shock proteins, cochaperones, and the ubiquitin E3 ligase carboxy terminus of Hsp70-interacting protein (189). This degradation pathway is important for the quality control of ER α because it maintains appropriate steady-state receptor levels in the cytoplasm and is responsible for the clearance of misfolded ER α . Recent data demonstrate that the oncogene E3 ubiquitin ligase MDM2 (mouse double minute-2) could be involved in this ligand-independent turnover of ER α (190).

Second, in the presence of E₂, the ER α half-life drops dramatically to 3–5 h (188, 191), and the receptors are targeted for degradation through a transcription-coupled pathway requiring new protein synthesis. During each binding cycle, ER α recruits specific ubiquitin-proteasome components to the target gene promoter (118–120, 187, 192, 193). Evidence from several studies shows that the inhibition of ubiquitin-proteasome activity blocks both ER α cycling and the activation of target gene expression despite increased ER α abundance obtained by immobilizing ER α on the nuclear matrix, as determined by fluorescence recovery after photobleaching (186). Métivier *et al.* (194) report that the initial steps of transcription are linked to monoubiquitination of the liganded ER α , and this process may enhance receptor interaction with DNA or coactivators. As transcription progresses, ER α is degraded as a consequence of the recruitment of several proteins implicated in the proteasome system. The proteins putatively involved are: 1) ER α E3 ubiquitin ligases like E6-AP (118, 195), MDM2 (187, 190, 196), and EFP (estrogen-responsive finger protein) (197); 2) the low molecular mass polypeptide 2 (LMP2) subunit of the 26S proteasome (193) and the 26S protease regulatory subunit 8 (PRS8/SUG1) in the 19S regulatory cap of the proteasome (187); and 3) the coactivators SRC-1 and SRC-3. SRC-1

interacts directly with LMP2, and this recruitment of LMP2 by SRC coactivators is necessary for cyclic association of ER-regulated transcription complexes on ER targets (193). SRC-3 has been shown to be required for the E₂-dependent turnover of ER α through interaction with the ubiquitin-E3 ligase EFP (198).

And third, in the presence of fulvestrant or other SERD like RU58668, ER α is targeted to degradation independently of transcriptional activity and new protein synthesis (120, 121, 199). Fulvestrant induces ER α degradation by dissociating the Hsp90-ER α complex and immobilizing ER α to the nuclear matrix by inducing its association with CK8 and CK18, two members of the family of nuclear matrix intermediate filament structural proteins, for subsequent degradation (200).

Although ER α ubiquitination was well documented, the target K302 and K303 have only recently been identified. Both lysines protect ER α from basal degradation and are necessary for efficient E₂- and fulvestrant-induced turnover in breast cancer cells (201). As previously demonstrated by *in vitro* ubiquitination assays, in the presence of E₂, K302 and K303 are monoubiquitinated by the ubiquitin ligase BRCA1/BARD1 (183, 202). But the impact of K302 monoubiquitination on ER α stability is unknown, and the possible existence of other ubiquitination sites has not been ruled out.

A recent publication has shown that the protein OTU domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates the receptor and represses its transcriptional activity. OTUB1 also regulates endogenous ER α level by stabilizing the protein on the chromatin (203).

5. Ubiquitination of ER β

The carboxy terminus of Hsp70-interacting protein binds to the N-terminal domain of the receptor, which is ubiquitinated to induce ER β degradation and the cessation of transcription (204). Suppressor of Gal 1, a regulatory subunit of the 26S proteasome, is also involved in ER β degradation in a ligand-dependent manner (205), but the target lysines have not been identified so far.

6. Sumoylation of ER α

Although other steroid receptors contain clearly identifiable ψ KXE small ubiquitin-related modifier (SUMO) acceptor sites, neither ER α nor ER β matches this consensus sequence (19). Nevertheless, ER α has been described to be sumoylated by SUMO-1 (206). This sumoylation, which occurs in overexpressed and endogenous ER α and is dependent on the presence of ER α ligands like E₂ or tamoxifen, targets five lysines located in the hinge region: K266, K268, K299, K302, and K303. In addition, ER α

sumoylation is stimulated in the presence of the SUMO E3 ligases PIAS1 and PIAS3 (protein inhibitor of activated signal transducer and activator of transcription). Because mutations that prevented SUMO modification impaired ER α -induced transcription through decreased receptor binding to DNA without affecting ER α nuclear localization, ER α sumoylation results in enhanced ER α transcriptional activity (206). The sumoylation of ER β has not yet been described, but it would be of interest to determine whether this modification could be involved in the regulation of ER β activity.

7. Lysine methylation of ER α

Although lysine methylation is commonly attributed to histones, methylation has recently been described in non-histone proteins such as p53 or DNA methyltransferase. Methylation on K residues is a complex process because a lysine can be mono-, di-, or trimethylated (207). Monomethylation of ER α at K302 is mediated by SET7 lysine methyltransferase; this modification acts on ER α stability and facilitates the recruitment of ER α to its target genes for their transactivation (208). However, the timing of this modification has not been studied in detail because the endogenous modified form of ER α has been undetectable.

8. Other modifications

Other modifications have been identified in ER α , although they have not been studied in details. These include S-nitrosylation, which occurs in nonidentified ER cysteine residues and results in inhibition of DNA binding at specific ERE (209). ER α glycosylation has also been reported, but the targeted residues have been identified only for murine receptors (210, 211). Recently, a systematic study of ER α PTM by tandem mass spectrometry has identified new sites, but their function has not been clarified (212).

B. PTM involved in ER nongenomic signaling

Although E₂ rapid effects are well documented, the molecular mechanisms involved remain elusive. It is not clear how the signals are initiated. Recently, some ER α PTM have been shown to be involved in nongenomic signaling, which gives new insight into this pathway.

1. Palmitoylation of ER α and ER β

Palmitoylation is the attachment of a long chain of fatty acids that targets proteins to membrane microdomains (lipid rafts and caveolae). ER α was long ago reported to be located at the plasma membrane (213). Cycles of palmitoylation and depalmitoylation affect protein activation and allow protein movements within membrane subdomains. The small population of ER α localized at the plasma membrane is known to be palmitoylated on Cys447 by palmitoyl acyltransferase (PAT) (214). Upon

E₂ binding, ER α undergoes depalmitoylation and dissociates from caveolin-1, which facilitates ER α association with signaling molecules like Src and PI3K. S-Palmitoylation is a critical step for E₂-induced rapid events because the unpalmitoylable ER α mutant does not induce E₂ proliferative effects (106, 215). The plant-derived flavonoid naringenin is known to inhibit estrogen nongenomic signaling through a rapid depalmitoylation of the receptor (216). Targeting this modification could be a good strategy for antagonizing estrogen proliferative effects.

ER β has also been shown to localize at the plasma membrane through palmitoylation (217). The site of palmitoylation has not been clearly identified, but C399 is a good candidate because it is conserved with ER α binding (218). In ER β , contrary to observation in ER α , E₂-decreased palmitoylation increases receptor association with caveolin-1. The outcome effect is also totally different because ER β palmitoylation is necessary for the p38-dependent activation of proapoptotic cascades (219).

2. Phosphorylation of ER α on tyrosine

The phosphorylation of Y537 was first reported to regulate E₂ binding in MCF-7 cells and the ability of ER α to interact with kinases containing SH2 domains (220–222). *In vitro* data suggest that Src tyrosine kinases (p56^{lck} and p60^{c-src}) could be responsible for this phosphorylation (223). Auricchio *et al.* (224) recently obtained interesting results using peptides containing phosphoY537. They have shown that the phosphorylated peptide inhibits G₁/S transition by preventing ER α /Src interactions induced by E₂ in MCF-7 cells. This peptide also inhibits the growth of mammary cancer cell xenografts, supporting its potential therapeutic interest (224, 225).

Finally, *in vitro* results from Katzenellenbogen's lab (226) strongly indicate that Src phosphorylates ER α on other tyrosine residues.

3. Arginine methylation of ER α

Recently, our team reported a novel paradigm of ER α regulation through arginine methylation by protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1), which transiently methylates R260 within the ER α DBD (227). The methylated ER α is localized exclusively in the cytoplasm of breast epithelial cells. This methylation event is required for mediating the extranuclear function of the receptor by triggering its interaction with the p85 subunit of PI3K, Src, and the focal adhesion kinase, and thereby propagating the signal to downstream transduction cascades via Akt activation (228). The transient methylation of the receptor suggests that a putative arginine demethylase could be involved in the regulation of this process.

Rapid down-regulation of ER α methylation and/or Src activity may serve to control rapid physiological responses to estrogen, inducing the dissociation of the complex and ultimately the repression of downstream kinase activation.

In conclusion, for ER α , although phosphorylation sites are scattered throughout the protein, the other modifications are highly concentrated around the hinge region (Fig. 3) and sometimes even on the same residue (K302, for instance, is targeted for multiple modifications), which facilitates cross talks between modifications. It is important to decipher the interplay between ER PTM and to determine precisely which PTM will be impacted if a given enzyme is targeted.

C. Molecular events affecting ER PTM

1. ER mutations

Although the number of mutations affecting ER α in breast tumors is relatively low (129), the impact of PTM on ER signaling is indirectly supported by ER α mutations affecting PTM target sites of the receptor. For example, the Y537N mutant (phosphorylated site) identified in tumors of metastatic breast cancer patients has been shown to confer a constitutive transactivation function to the receptor (229).

It has also been shown that the K303R mutation (a multimodified residue) associated with breast cancer modifies K302 methylation both *in vitro* and *in vivo* (208). The K303R mutant leads to hyperphosphorylation of ER α by PKA (230) and by Akt-dependent pathways (165) at residue 305, suggesting a cross talk between ER α acetylation and phosphorylation. Moreover, the K303R mutation has been shown to result in altered recruitment of coactivators or corepressors like calmodulin or BRCA1 (183, 231). Interestingly, the K303R mutation of ER α has been found associated with predictors of unfavorable outcome and poor prognosis like lymph node positivity or enlarged tumor size (232). Altogether, these observations suggest that events affecting K303 (PTM or mutations) might seriously affect the functional role of ER α through a deregulation of ER α PTM.

2. Cross talk between ER PTM

A protein can be modified by more than one type of PTM or by the same PTM at different residues. The occurrence of several PTM, acting sequentially and/or in concert, seems to be a very efficient mechanism to initiate, terminate, or fine-tune the outcome of signaling pathways.

Although the implications of individual ER modifications such as phosphorylation, acetylation, and methylation have been relatively well documented, interactions between these modifications remain to be elucidated. It

appears that one modification may be coupled to the enhancement or suppression of another one at the same or a nearby residue.

In this context, we will try to discuss the known interplay between PTM and to investigate other potential ones.

3. Phosphorylation and phosphorylation

The first cross talk between two phosphorylation sites, S118 and S305, in ER α has been described by the group of Kumar (233). They have found that ER α phosphorylation by PAK1 on S305 influences the activation status of S118 and that the S305-associated ER α transactivation activity requires a functional S118 (233). This cross talk has not been analyzed in clinical studies, but it has been shown that transgenic mice expressing a kinase-active PAK1 exhibit both activated ER α -305 and ER α -S118.

Although less well-documented, a positive cross talk also exists between S104, S106, and S118 (136).

4. Phosphorylation and acetylation

K303 resides adjacent to a phosphorylation site, S305, and a negative cross talk has been found between S305 phosphorylation and K303 acetylation (230). Mutation of S305 to E305 mimicking constitutive phosphorylation blocks K303 acetylation and generates an enhanced transcriptional response. This cross talk could partially explain the link between the phosphorylation of S305 and tamoxifen resistance in breast tumors. On the contrary, the phosphorylation of S118 and S167 positively regulates ER acetylation (183).

5. Phosphorylation and ubiquitination

Multiple agents regulating phosphorylation also impact ER α proteolysis (183, 234). A direct link between ER α phosphorylation and ubiquitination has been established. S118 plays an important role in E₂-mediated ER α degradation by regulating differential recruitment of factors mediating proteolysis (183, 235, 236).

A recent study by the group of Tremblay has shown that ER β phosphorylation serves as a signal for receptor ubiquitination and degradation (170). The recruitment of the E3 ubiquitin ligase E6-AP to mouse ER β is induced by Erk phosphorylation at S94 (conserved at S75 in hER β) and S106 (equivalent to hS87), but the target lysines have not been identified.

6. Phosphorylation and glycosylation

It appears that reciprocal occupancy of S80 (conserved at S60 in hER β) by either O-phosphate or O-GlcNAc modulates the degradation and activity of mER β . In fact, the saccharide may act by blocking the addition of phosphate, which itself targets the protein for rapid degradation (169). This interplay is another good example of co-

ordinated modifications responsible for regulating ER β activity.

7. Acetylation and methylation

Because ER α K302 can be either acetylated or methylated, one could imagine a competition between the two modifications. *In vitro* experiments have shown that a previously acetylated ER α peptide is a poor substrate for SET7-induced methylation (208). Given the fact that lysine methylation stabilizes ER α , this negative cross talk may destabilize the receptor mediating the inhibitory effect of K303 acetylation on transcription.

8. Methylation and ubiquitination

Estrogen-stimulated ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome play an important role in ER transcriptional activity (187). Given that K302 methylation can stabilize ER α , this modification could be antagonistic to ubiquitination because of direct competition for the same lysine residue. Because methylated lysine residues can serve as docking sites for binding proteins through bromo- or chromodomains, the formation of new complexes would thereby limit ER α ubiquitination and degradation. Calmodulin would be a good candidate because K302 falls within a calmodulin-binding motif, and its binding to ER α prevents ubiquitination by E6-AP and degradation of the receptor. Interestingly, K302 mutation has been shown to reduce interactions between the two proteins (237). As a consequence, targeting K302 methylation could help to increase the degradation of ER α . In addition, K302 methylation could recruit a methyl lysine-binding protein that would, in turn, modulate ER α degradation through regulating the recruitment of E3 ubiquitin ligases.

In conclusion, several interactions between PTM have been described *in vitro*, but one must be careful in interpreting these results because most studies have been performed with mutants. One cannot exclude that the observed effects are due to conformational changes of the receptors rather than to a change in the modification. To integrate these findings for a better understanding of their significance, the next step will be to study the correlations between PTM *in vivo* (knock-in mice and patient tumors).

Finally, it is reasonable to assume that ongoing studies should clarify the combinatorial relationships between the different PTM and help to unravel ER-dependent gene transcription and to improve response to endocrine therapy.

D. ER PTM deregulated in breast cancer

The presence or absence of ER α is a well-established prognostic marker in breast cancer (at least in the early years after diagnosis) and a predictive marker for endo-

crine therapy (238–240). Because ER PTM have been shown to affect hormone sensitivity and localization, receptor stability, and/or ER transcription activity, it is tempting to speculate that immunohistochemical detection and quantification of these PTM could be an important new prognostic or predictive biomarker for tumor evaluation. Studies with antibodies specific to PTM have shown that several ER α modifications are deregulated in breast tumors, although it is so far unclear whether these deregulations are a cause or a consequence of the disease. Three phosphorylation sites of ER α (S118, S167, and S305) have received particular attention, especially because they have been implicated in ligand-independent activation of ER α . This section will focus mainly on ER α because almost nothing is known yet about ER β PTM in breast tumors. A list of the PTM found to be deregulated in breast tumors and the corresponding survival outcome are given in Table 3.

1. S118 of ER α

Immunohistochemical studies of pS118-ER α expression have found a significant positive correlation with active p-MAPK (241–245), active p-Akt (244, 246), and p-p90-RSK (246), suggesting that these kinases may be involved, directly or indirectly, in the S118 phosphorylation of ER α *in vivo*. High pS118-ER α expression levels have been associated in breast tumors with more differentiated phenotype, lower grade, and other markers of good prognosis such as ER α or progesterone receptor (241–244, 247–249). Concerning its predictive value for response to tamoxifen, the clinical studies yielded conflicting results. In fact, four studies do not associate S118

phosphorylation with tamoxifen response (243, 244, 250, 251), although other groups found this phosphorylation associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen (242, 248, 252), and higher levels are found in ER α -positive cancer patients who respond to tamoxifen than in those who progress. These discrepancies probably result from the use of different antibodies in small nonrandomized patient series. Recently, a randomized study of 239 patients has confirmed that pS118-ER α is associated with tamoxifen response (248), and Generali *et al.* (253) have described this modification as an independent factor for endocrine responsiveness in patients receiving AI (letrozole)-based treatment, confirming that when this residue is phosphorylated, patients are more likely to respond to endocrine therapy.

2. S167 of ER α

In ER-positive primary breast cancers, pS167-ER α has been shown to be positively correlated with p-MAPK (244, 246), p-p90-RSK (246), and p-Akt (244, 246). pS167-ER α is also associated with good prognostic factors (such as lower tumor grade or lymph node negativity) and with increased relapse-free and overall survival (246). pS167-ER α has been found to be predictive of response to endocrine therapy (250). These data strongly suggest that phosphorylation of ER α at S167 could be a useful marker for selecting the patients who are most likely to benefit from endocrine therapy.

3. S305 of ER α

A number of *in vitro* studies have indicated that phosphorylation of S305 by PKA and/or PAK1 in ER α resulted

TABLE 3. ER PTM deregulated in breast cancer

| Amino acid | Status in breast tumors | Survival outcome | Marker | References |
|----------------------|-------------------------------------------|------------------|----------------------|------------|
| ER α S104/106 | Hyperphosphorylation | Good | ND | 249 |
| ER α S118 | Hyperphosphorylation | Good | Tam response | 242 |
| | | Good | Tam response | 248 |
| | | Poor | Not for Tam response | 250 |
| | | Good | ND | 241 |
| | | Good | Good prognosis | 243 |
| | | Good | ND | 249 |
| | Hypophosphorylation | Good | Tam response | 244 |
| ER α S167 | Hyperphosphorylation | Good | Good prognosis | 246 |
| | | Good | Tam response | 250 |
| | | Good | Good prognosis | 244 |
| | | Good | ND | 249 |
| ER α R260 | Hypermethylation | ND | ND | 227 |
| ER α S282 | Hyperphosphorylation | Good | ND | 249 |
| ER α K303 | Mutated to arginine | Poor | Poor prognosis | 232 |
| ER α S305 | Hyperphosphorylation after PKA activation | Poor | Tam resistance | 157 |
| | Hyperphosphorylation | Poor | Tam resistance | 162, 257 |
| ER α T311 | Hyperphosphorylation | Poor | ND | 249 |
| ER α S559 | Hyperphosphorylation | Good | ND | 249 |
| ER β S105 | Hyperphosphorylation | Good | ND | 261 |

ND, Not determined; Tam, tamoxifen.

in enhanced transactivation of ER (158, 161) and was associated with tamoxifen resistance (157, 161).

A link between PKA expression, ER α phosphorylation on S305, and resistance to tamoxifen has been demonstrated in breast cancer patients (157), consistent with early data from clinical studies correlating deregulation of PKA with tamoxifen resistance (254). Other studies have associated tamoxifen resistance with nuclear expression or amplification of PAK1 (255, 256).

A recent clinical study of a large series of tumors from node-negative postmenopausal breast cancer patients has established that the concomitant expression of nuclear PAK1 and pS305ER α correlates with reduced response to tamoxifen, suggesting a putative importance of this signaling pathway for treatment prediction. Furthermore, lack of nuclear pS305ER α or of nuclear PAK1 expression results in tamoxifen-improved response in postmenopausal breast cancers (257).

Although validating the correlation between PAK1 expression and tumor progression after tamoxifen treatment, the work by Michalides and colleagues (162) shows no direct link between PAK1 expression and pS305ER α . This analysis concludes that both PAK1 and PKA/pS305ER α levels are associated with sensitivity to tamoxifen in breast tumors, and the combination of these variables is predictive of tamoxifen benefit (162). Furthermore, a gene expression analysis has shown an enrichment of the PKA pathway in pS305ER α -positive tumors, but not of the PAK1-related pathway.

The discrepancy between these studies can be explained by the use of distinct anti-phosphoantibodies and differences between patients: premenopausal breast cancer (257) *vs.* postmenopausal (162) patients.

In conclusion, phosphorylation of ER α at S305 could be a new predictive marker for tamoxifen response, and targeting PKA to block S305 ER α phosphorylation represents a promising new strategy to prevent or to reverse endocrine resistance.

4. S282 and T311 of ER α

Phosphorylation of S282 is associated with better disease outcome (longer relapse-free survival) and phosphorylation of T311 with poor clinical outcome (decreased relapse-free survival) in women treated with tamoxifen (249).

5. R260 of ER α

The use of an antibody specific for ER α methylated on R260 has shown that this modification is relatively rare in normal epithelial breast tissue and that its expression is deregulated in breast tumors. ER α methylation status varies between tumors. In fact, ER α is hypermethylated in about 55% of invasive breast tumors (227). This deregu-

lation could be due to an overexpression of the arginine methyltransferase PRMT1 because isoforms of the enzyme have been shown to be overexpressed in breast tumors (258). So far, no correlation with clinical outcome or clinical parameters has been evidenced, and whether this modification is a cause or a consequence of the disease is still under investigation.

6. K303 of ER α

K303, a hot spot for PTM, was first shown to be mutated to arginine in ductal hyperplasia (259) and more recently in invasive breast tumors (232, 260). This mutation has been significantly associated with aggressive biological behavior and has been shown to be a marker of poor prognosis associated with reduced relapse-free survival (232). K303 mutation triggers ER α hypersensitivity to estrogen and resistance to tamoxifen and aromatase inhibitors (163). This hyperactivity is partly due to the hyperphosphorylation of the adjacent S305. Given that K303 can be modified by sumoylation, acetylation, or ubiquitination, and that it regulates K302 lysine methylation (208), we can speculate that this mutation disrupts one or more of these modifications, thereby inducing ER α hypersensitivity. For example, the mutation impeding acetylation triggers S305 phosphorylation and ER α hyperactivation. This is a striking example of the importance of understanding the complex relationship between ER PTM for deciphering the mechanisms of endocrine resistance and circumventing this major problem in breast cancer treatment.

7. S105 of hER β (equivalent to S124 of mER β)

An antibody specific for ER β phosphorylated on the S105 residue has been used to analyze its expression in tamoxifen-treated breast tumors. S105 phosphorylation is associated with better survival, even in tamoxifen-resistant cases (261). However, these results need to be confirmed on other cohorts of patients before S105 can be considered as a potential new marker.

IV. Discussion

Over the last several years, numerous studies have reported that ER, particularly ER α , are subject to a plethora of PTM in response to different stimuli and that these PTM differentially regulate the functions of these receptors, adding another layer of complexity to the regulation of estrogen signaling.

Some of these PTM are deregulated in breast cancer, even if we ignore whether they are just a consequence of the disease or they actually play a role in breast tumorigenesis. However, literature data show that they could at

least constitute new prognosis and/or predictive markers for the disease.

ER α phosphorylation, the most extensively studied PTM to date, has been shown to play important roles in most, if not all, estrogen-regulated pathways. In particular, a number of *in vitro* studies have shown that some ER α phosphorylation sites are clearly involved in endocrine therapy responsiveness. To validate the significance of these observations, several groups have investigated the relevance of various ER α phosphorylation sites by immunohistochemical detection in breast tumors. Many studies have focused on the phosphorylation of S118, S167, and S305. The obtained results illustrate the complexity of identifying a specific marker of the emergence of endocrine resistance. Indeed, contrary to what had been expected from *in vitro* observations, pS118-ER α and pS167-ER α do not seem to be associated *in vivo* with *de novo* endocrine resistance. Indeed the presence of pS118-ER α or pS167-ER α has been associated with better outcome in patients on endocrine therapy (162, 242, 245, 246, 252, 253), suggesting that these two ER α PTM could rather indicate good prognosis and responsiveness to endocrine therapy. Conversely, *in vitro* and clinical studies have validated that pS305-ER α modification is strongly associated with endocrine resistance because high pS305-ER α expression level is a predictive biomarker for endocrine therapy responsiveness. However, contradictory *in vivo* data from other groups (243, 244, 250, 251) have highlighted the complexity of such evaluation. The controversial results published could reflect differences in the antibodies used, in the stability of the phosphoepitopes during tumor collection and storage, in the size of the study cohorts, in the pre- or postmenopausal status of the patients, in the type of molecule used (ER ligand or AI) for endocrine therapy, and/or in the type of treatment (short-term neoadjuvant *vs.* long-term adjuvant endocrine therapy).

The limitation of the clinical studies described above can arise from the analysis of a single biomarker to distinguish between responders and nonresponders to endocrine therapy. Indeed, each phosphorylation could alter the receptor function in a distinctive manner, individually or in combination. So, it would be important to develop new scores combining several PTM and allowing more accurate identification of the patients likely to benefit from endocrine therapy.

In this context, recent studies from the laboratory of L. C. Murphy (252) have demonstrated the presence of multiple phosphorylated isoforms of ER α (S104/106, S118, S167, S282, S294, T311, and S559) in breast tumors. Interestingly, they have shown that any individual phosphoepitope is positively correlated with at least two others, and pS559 is positively correlated with all other

epitopes (252). They have also investigated the relationship between these phosphorylated forms of ER α and clinical outcome after tamoxifen therapy in 300 patients with ER α -positive breast tumors (249). Interestingly, they have found that phosphoepitopes clustered in the N terminus of ER α (S104/106, S118, S167, S282, S294) are predictors of good outcome, whereas other epitopes clustered toward the C terminus (T311 and S559) are predictors of bad outcome. Accordingly, the authors propose a “phospho-score” that, by taking into account seven phospho-sites on ER α , integrates both “good” and “bad” sites. This score has been shown to be a statistically significant independent predictor of overall survival and relapse-free survival in tamoxifen-treated ER-positive patients (249). Along this line, the FRET analysis published by Zwart *et al.* (30) has illustrated that the combinations of ER α phospho-modifications lead to different conformational changes upon each antiestrogen treatment. In consequence, we can speculate on the existence of a specific code for each type of endocrine therapy.

Additional complexity has been introduced with a recent study describing that the hyperphosphorylation of ER β on the S105 residue is associated with improved disease-free and overall survivals in breast tumor samples (261), suggesting that ER β modification should be included in the “phospho-score.”

Investigations of the relationship between modifications of ER α and resistance to hormone therapy have mainly focused on phosphorylation. As discussed above, ER α also undergoes several other modifications affecting multiple sites. However, these modifications are less well characterized, and because of the unavailability of specific antibodies, their *in vivo* significance is poorly understood. Little or no *in vivo* studies have been published about other ER PTM, and the preliminary data obtained need to be validated on independent cohorts.

Given the complexity described above, assessing the expression of the different molecules involved in ER modifications might allow more accurate selection of patients with different responses to endocrine therapy. The enzymes triggering the PTM have not yet been clearly identified, and very little is known about the enzymes responsible for reversing these modifications. Actually, in breast tumor samples, a significant positive correlation has been found between the expression of p-MAPK or p-Akt and pS167- or pS118-ER α and between p-p90-RSK and pS118-ER α , indicating that these kinases participate directly or indirectly in these modifications (241–246). In addition, two recent studies have shown that combinations of pS305ER α and nuclear PAK1 (257) or PKA/pS305ER α and PAK1 are more powerful in predicting response to tamoxifen (162).

Altogether, these data suggest that assessing the PTM code of ER α , either individually or in association with the expression and/or activity of the enzymes responsible for these PTM, could provide an efficient personalized anti-estrogen therapy.

V. Future Directions

At present, ER α status is the only factor used routinely for prediction of response to endocrine therapy and patient selection in breast cancer. As we have largely discussed above, PTM play a pivotal role in the regulation of ER α functions, and their deregulation is clearly involved in phenomena of resistance to endocrine therapies in breast cancer patients.

Before we can elucidate the mechanisms by which breast cancers evade antiestrogen-mediated growth arrest, we need to understand how PTM regulate ER actions. Undoubtedly, our understanding of these dynamic modifications is still at an early stage due to the lack of appropriate tools to monitor modifications of endogenous proteins. Future studies should investigate how a specific modification regulates a subset of ER target genes to determine specificity and how these different modifications act, sequentially and/or in concert, under physiological and pathological conditions. Using proteomic approaches, including developing site- and modification-specific antibodies and employing mass spectrometry techniques, would allow a better understanding of the regulation of these dynamic modifications *in vivo*. Furthermore, genetic approaches, such as the generation of modification-deficient ER knock-in animals, would provide new insights into the possible physiological functions of these modifications. Important efforts should also be made to better define the actors involved in PTM regulation, notably the enzymes responsible for reversing ER PTM.

New treatments targeting the molecules responsible for modifying or reversing PTM could be used in combination with endocrine therapies or after treatment failure or acquired resistance. However, specifically targeting PTM in breast cancer cells is a prerequisite to any efficient therapy because most of the enzymes involved in such modifications are present in both the tumor and healthy tissues and treatment may cause a wide range of unwanted side effects. Important advances have been made in this direction with the development of nanocarriers loaded with cytotoxic drugs (stealth liposomes, for example) characterized by a prolonged blood circulation time when injected iv [for review, see Urbinati *et al.* (273)].

Many approaches and avenues remain unexplored in developing targeted drugs for effective blockade of ER α signaling. We can anticipate that in the future, thanks to the ER posttranslational code, a molecular subtyping of individual tumors will help to define the antihormonal treatment for each patient.

Acknowledgments

We thank M. D. Reynaud for reading the manuscript. The illustrations were created by using Servier Medical Art.

Address all correspondence and requests for reprints to: Muriel Le Romancer, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Bâtiment Cheney D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. E-mail: leroman@lyon.fnclcc.fr.

This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), the Hauts de Seine committee from the Ligue Nationale Contre le cancer (to J.-M.R.), the Rhône committee from the Ligue Nationale Contre le cancer (to P.C.), the Saône et Loire committee from the Ligue Nationale Contre le cancer (to P.C.), and the Association pour la Recherche sur le Cancer. C.P. is supported by a fellowship from the French Ministry of Research.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Couse JF, Korach KS 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358–417
2. Santen RJ, Boyd NF, Chlebowski RT, Cummings S, Cuzick J, Dowsett M, Easton D, Forbes JF, Key T, Hankinson SE, Howell A, Ingle J 2007 Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. *Endocr Relat Cancer* 14:169–187
3. McDonnell DP, Norris JD 2002 Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296:1642–1644
4. Levin ER 2009 Membrane oestrogen receptor α signalling to cell functions. *J Physiol* 587:5019–5023
5. Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH 1999 Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor α and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 53:217–227
6. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA 2000 Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19:4970–4978
7. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA 2004 Estrogen receptor β inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1566–1571
8. Treeck O, Latruch C, Springwald A, Ortmann O 2010 Estrogen receptor β exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 120:557–565
9. Behrens D, Gill JH, Fichtner I 2007 Loss of tumourigenicity of stably ER β -transfected MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 274:19–29

10. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F 2001 ER β inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 142:4120–4130
11. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson JA 2008 A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor β on estrogen receptor α signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27:1019–1032
12. Colditz GA 1998 Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:814–823
13. Crandall DL, Busler DE, Novak TJ, Weber RV, Kral JG 1998 Identification of estrogen receptor β RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 248:523–526
14. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC 1999 Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474–1481
15. Ali S, Coombes RC 2002 Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2:101–112
16. Taylor SE, Martin-Hirsch PL, Martin FL 2010 Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett* 288:133–148
17. Barone I, Brusco L, Fuqua SA 2010 Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. *Clin Cancer Res* 16:2702–2708
18. Herynk MH, Fuqua SA 2004 Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 25:869–898
19. Faus H, Haendler B 2006 Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother* 60:520–528
20. Hall JM, McDonnell DP 2005 Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv* 5:343–357
21. Lannigan DA 2003 Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* 68:1–9
22. Ward RD, Weigel NL 2009 Steroid receptor phosphorylation: assigning function to site-specific phosphorylation. *Biofactors* 35:528–536
23. Popov VM, Wang C, Shirley LA, Rosenberg A, Li S, Nevalainen M, Fu M, Pestell RG 2007 The functional significance of nuclear receptor acetylation. *Steroids* 72:221–230
24. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM 1995 The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835–839
25. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA 2008 Estrogen receptor β : an overview and update. *Nucl Recept Signal* 6:e003
26. Tsai MJ, O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451–486
27. Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P 1989 The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477–487
28. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925–5930
29. Mosselman S, Polman J, Dijkema R 1996 ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49–53
30. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neeffjes J, Mancini MA, Michalides R 2010 The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *J Cell Sci* 123:1253–1261
31. Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA 2001 Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535–1565
32. Magee PJ, Rowland IR 2004 Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 91:513–531
33. Miodini P, Fioravanti L, Di Fronzo G, Cappelletti V 1999 The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer* 80:1150–1155
34. Jordan VC, O'Malley BW 2007 Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5815–5824
35. Smith CL, O'Malley BW 2004 Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25:45–71
36. Dowsett M, Nicholson RI, Pietras RJ 2005 Biological characteristics of the pure antiestrogen fulvestrant: overcoming endocrine resistance. *Breast Cancer Res Treat* 93(Suppl 1):S11–S18
37. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J 1991 A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 51:3867–3873
38. Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA 2006 International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58:773–781
39. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS 2005 Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol* 67:285–308
40. Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O 1998 Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15677–15682
41. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O 1993 Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11162–11166
42. Tee MK, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvorovic A, An J, Christy RJ, Yamamoto KR, Leitman DC 2004 Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors α and β . *Mol Biol Cell* 15:1262–1272
43. Monroe DG, Getz BJ, Johnsen SA, Riggs BL, Khosla S, Spelsberg TC 2003 Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ER α or ER β . *J Cell Biochem* 90:315–326
44. Shim GJ, Wang L, Andersson S, Nagy N, Kis LL, Zhang Q, Mäkelä S, Warner M, Gustafsson JA 2003 Disruption of the estrogen receptor β gene in mice causes myeloprolifer-

- ative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6694–6699
45. Vivar OI, Zhao X, Saunier EF, Griffin C, Mayba OS, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP, Leitman DC 2010 Estrogen receptor β binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J Biol Chem* 285:22059–22066
 46. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG 1997 Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 272:19858–19862
 47. Papoutsis Z, Zhao C, Putnik M, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K 2009 Binding of estrogen receptor α/β heterodimers to chromatin in MCF-7 cells. *J Mol Endocrinol* 43:65–72
 48. Gougelet A, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM 2007 Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER) β -mediated transcriptional repression of ER α . *J Steroid Biochem Mol Biol* 104:110–122
 49. Hall JM, McDonnell DP 1999 The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140:5566–5578
 50. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, Hilty K, Webb P, Uht RM, Price Jr RH, Pestell RG, Kushner PJ 2002 Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 277:24353–24360
 51. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC 2004 Estrogen receptor β inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64:423–428
 52. Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F 2001 Minireview: genomic organization of the human ER α gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15:2057–2063
 53. Trivedi S, Piccart M, Muquardt C, Gilot N, Hadiy S, Patel D, Leclercq G 1996 Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 40:231–241
 54. Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F 2001 ER α gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 15:2064–2077
 55. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA 2009 Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER α 46 in human macrophages. *PLoS One* 4:e5539
 56. Li L, Haynes MP, Bender JR 2003 Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor α variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4807–4812
 57. Flouriot G, Brand H, Denger S, Metivier R, Kos M, Reid G, Sonntag-Buck V, Gannon F 2000 Identification of a new isoform of the human estrogen receptor- α (hER- α) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER- α activation function 1. *EMBO J* 19:4688–4700
 58. Penot G, Le Péron C, Mérot Y, Grimaud-Fanouillère E, Ferrière F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Métivier R, Flouriot G 2005 The human estrogen receptor- α isoform hER α 46 antagonizes the proliferative influence of hER α 66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474–5484
 59. Garcia T, Lehrer S, Bloomer WD, Schachter B 1988 A variant estrogen receptor messenger ribonucleic acid is associated with reduced levels of estrogen binding in human mammary tumors. *Mol Endocrinol* 2:785–791
 60. Fuqua SA, Fitzgerald SD, Allred DC, Elledge RM, Nawaz Z, McDonnell DP, O'Malley BW, Greene GL, McGuire WL 1992 Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res* 52:483–486
 61. McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SA 1991 Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol* 5:1571–1577
 62. Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Emberts CG, McConda DB, Barry PN, Magnusen JE 2010 Estrogen receptor α 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor α 66-regulated target gene transcription. *Mol Cell Endocrinol* 323:268–276
 63. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF 2005 Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1023–1027
 64. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF 2006 A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:9063–9068
 65. Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY 2011 A positive feedback loop of ER- α 36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30:770–780
 66. Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, Wang Z, Xie Y 2009 Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 27:3423–3429
 67. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM 1998 Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 247:75–78
 68. Saunders PT, Millar MR, Macpherson S, Irvine DS, Groome NP, Evans LR, Sharpe RM, Scobie GA 2002 ER β 1 and the ER β 2 splice variant (ER β cx/ β 2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2706–2715
 69. Davies MP, O'Neill PA, Innes H, Sibson DR, Prime W, Holcombe C, Foster CS 2004 Correlation of mRNA for oestrogen receptor β splice variants ER β 1, ER β 2/ER β cx and ER β 5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *J Mol Endocrinol* 33:773–782
 70. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC 2006 Expression of oestrogen receptor- β in estrogen receptor- α negative human breast tumours. *Br J Cancer* 95:616–626
 71. Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM 2005 Estrogen receptor α and β subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophi-

- lin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:71–81
72. Jensen EV 1991 Steroid hormone receptors. *Curr Top Pathol* 83:365–431
73. Sabbah M, Redeuilh G, Secco C, Baulieu EE 1987 The binding activity of estrogen receptor to DNA and heat shock protein (Mr 90,000) is dependent on receptor-bound metal. *J Biol Chem* 262:8631–8635
74. Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG 2010 Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* 11:109–123
75. Lonard DM, O'Malley BW 2006 The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125:411–414
76. Robyr D, Wolffe AP, Wahli W 2000 Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14:329–347
77. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M 2000 Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103:843–852
78. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2005 Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365:1687–1717
79. Gradishar WJ 2005 The future of breast cancer: the role of prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 89(Suppl 1):S17–S26
80. York B, O'Malley BW 2010 Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J Biol Chem* 285:38743–38750
81. Kirkegaard T, McGlynn LM, Campbell FM, Müller S, Tovey SM, Dunne B, Nielsen KV, Cooke TG, Bartlett JM 2007 Amplified in breast cancer 1 in human epidermal growth factor receptor-positive tumors of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:1405–1411
82. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R 2003 Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:353–361
83. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P 2000 Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 74:311–317
84. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U 2004 Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 18:1859–1875
85. Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S 2000 Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 275:5379–5387
86. Björnström L, Sjöberg M 2004 Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept* 2:3
87. Quaedackers ME, van den Brink CE, van der Saag PT, Tertoolen LG 2007 Direct interaction between estrogen receptor α and NF- κ B in the nucleus of living cells. *Mol Cell Endocrinol* 273:42–50
88. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS 1997 Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 277:1508–1510
89. Johnston SR, Lu B, Scott GK, Kushner PJ, Smith IE, Dowsett M, Benz CC 1999 Increased activator protein-1 DNA binding and c-Jun NH2-terminal kinase activity in human breast tumors with acquired tamoxifen resistance. *Clin Cancer Res* 5:251–256
90. Schiff R, Reddy P, Ahotupa M, Coronado-Heinsohn E, Grim M, Hilsenbeck SG, Lawrence R, Deneke S, Herrera R, Chamness GC, Fuqua SA, Brown PH, Osborne CK 2000 Oxidative stress and AP-1 activity in tamoxifen-resistant breast tumors in vivo. *J Natl Cancer Inst* 92:1926–1934
91. Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S, Benz CC 2007 Enhanced NF κ B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 7:59
92. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P 1995 Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270:1491–1494
93. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguère V 1999 Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3:513–519
94. Sauvé K, Lepage J, Sanchez M, Heveker N, Tremblay A 2009 Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway. *Cancer Res* 69:5793–5800
95. Rhodes LV, Short SP, Neel NF, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S, Wei Y, Yu D, Sun M, Muir SE, Fonseca JP, Bratton MR, Segar C, Tilghman SL, Sobolik-Delmaire T, Horton LW, Zaja-Milatovic S, Collins-Burow BM, Wadsworth S, Beckman BS, Wood CE, Fuqua SA, Nephew KP, Dent P, Worthylake RA, Curiel TJ, Hung MC, Richmond A, Burow ME 2011 Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer. *Cancer Res* 71:603–613
96. Hammes SR, Levin ER 2007 Extracellular steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28:726–741
97. Olde B, Leeb-Lundberg LM 2009 GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab* 20:409–416
98. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS 1995 Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* 9:404–410
99. Levin ER 2009 Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20:477–482
100. Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER 2004 Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 18:2854–2865
101. Acconcia F, Manavathi B, Mascarenhas J, Talukder AH, Mills G, Kumar R 2006 An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor α interaction in cell migration. *Cancer Res* 66:11030–11038
102. Björnström L, Sjöberg M 2005 Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and non-genomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19:833–842

103. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F 2001 PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050–6059
104. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK 2000 Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538–541
105. Song RX, Zhang Z, Santen RJ 2005 Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16:347–353
106. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ 2004 The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2076–2081
107. Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW 2007 Direct interactions with G α i and G β γ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α . *Mol Endocrinol* 21:1370–1380
108. Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, Defilippi P 2004 p130Cas interacts with estrogen receptor α and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci* 117:1603–1611
109. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH 2004 Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor α . *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17126–17131
110. Fernando RI, Wimalasena J 2004 Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt. *Mol Biol Cell* 15:3266–3284
111. Pedram A, Razandi M, Evinger AJ, Lee E, Levin ER 2009 Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. *Mol Biol Cell* 20:3374–3389
112. Azuma K, Urano T, Horie-Inoue K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, Inoue S 2009 Association of estrogen receptor α and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res* 69:2935–2940
113. Catalano S, Barone I, Giordano C, Rizza P, Qi H, Gu G, Malivindi R, Bonfiglio D, Andò S 2009 Rapid estradiol/ER α signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 23:1634–1645
114. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME, Shaul PW 2002 ER β has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol* 16:938–946
115. Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F 2000 Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor β -Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J* 19:5406–5417
116. Ordóñez-Morán P, Muñoz A 2009 Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 8:1675–1680
117. MacGregor JI, Jordan VC 1998 Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50:151–196
118. Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW 1999 Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1858–1862
119. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW 2000 The 26S proteasome is required for estrogen receptor- α and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- α transactivation. *Mol Cell* 5:939–948
120. Wijayarathne AL, McDonnell DP 2001 The human estrogen receptor- α is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* 276:35684–35692
121. Marsaud V, Gougelet A, Maillard S, Renoir JM 2003 Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor α (ER α), differentially affect ER α extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:2013–2027
122. McDonnell DP, Dana SL, Hoener PA, Lieberman BA, Imhof MO, Stein RB 1995 Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci* 761:121–137
123. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP 1994 Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 8:21–30
124. Jensen EV, Jordan VC 2003 The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9:1980–1989
125. Johnston SR, Dowsett M 2003 Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3:821–831
126. Jordan VC 2004 Aromatase inhibitors that regulate estrogen target tissues selectively? *Bone* 34:372–375
127. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Cameron DA, Palmer MJ, Pater JL 2005 Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA. 17. *J Natl Cancer Inst* 97:1262–1271
128. Musgrove EA, Sutherland RL 2009 Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9:631–643
129. Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF 1995 Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:446–451
130. O'Malley BW, Qin J, Lanz RB 2008 Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol* 20:310–315
131. Li X, Lonard DM, Jung SY, Malovannaya A, Feng Q, Qin J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW 2006 The SRC-3/AIB1 coactivator is degraded in a ubiquitin- and ATP-independent manner by the REG γ proteasome. *Cell* 124:381–392
132. Margueron R, Duong V, Castet A, Cavailles V 2004 Histone deacetylase inhibition and estrogen signalling in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 68:1239–1246
133. Sanchez M, Picard N, Sauvé K, Tremblay A 2010 Challenging estrogen receptor β with phosphorylation. *Trends Endocrinol Metab* 21:104–110

134. Auricchio F, Migliaccio A 1980 In vitro inactivation of oestrogen receptor by nuclei: prevention by phosphatase inhibitors. *FEBS Lett* 117:224–226
135. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G, Rotondi A, Lastoria S 1984 Direct evidence of in vitro phosphorylation-dephosphorylation of the estradiol-17 β receptor. Role of Ca²⁺-calmodulin in the activation of hormone binding sites. *J Steroid Biochem* 20:31–35
136. Thomas RS, Sarwar N, Phoenix F, Coombes RC, Ali S 2008 Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor- α activity. *J Mol Endocrinol* 40:173–184
137. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, Grisouard J, Rincke G, Mayer D 2005 Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor α and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem* 280:33006–33014
138. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ 1999 Potentiation of human estrogen receptor α transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274:22296–22302
139. Masuhiro Y, Mezaki Y, Sakari M, Takeyama K, Yoshida T, Inoue K, Yanagisawa J, Hanazawa S, O'malley BW, Kato S 2005 Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8126–8131
140. Sheeler CQ, Singleton DW, Khan SA 2003 Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr Res* 29:237–255
141. Cheng J, Zhang C, Shapiro DJ 2007 A functional serine 118 phosphorylation site in estrogen receptor- α is required for down-regulation of gene expression by 17 β -estradiol and 4-hydroxytamoxifen. *Endocrinology* 148:4634–4641
142. Dutertre M, Smith CL 2003 Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- α : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol* 17:1296–1314
143. Shah YM, Rowan BG 2005 The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (α) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity. *Mol Endocrinol* 19:732–748
144. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D 1996 Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15:2174–2183
145. Ali S, Metzger D, Bornert JM, Chambon P 1993 Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J* 12:1153–1160
146. Chen D, Washbrook E, Sarwar N, Bates GJ, Pace PE, Thirunuvakkarasu V, Taylor J, Epstein RJ, Fuller-Pace FV, Egly JM, Coombes RC, Ali S 2002 Phosphorylation of human estrogen receptor α at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 21:4921–4931
147. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB 2005 Formation of an IKK α -dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 18:71–82
148. Weitsman GE, Li L, Skliris GP, Davie JR, Ung K, Niu Y, Curtis-Snell L, Tomes L, Watson PH, Murphy LC 2006 Estrogen receptor- α phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res* 66:10162–10170
149. González L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I, Lopéz E, González JJ, Martín-Pérez J, Aranda A 2009 Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 28:1298–1308
150. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC 1994 Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 8:1208–1214
151. Joel PB, Smith J, Sturgill TW, Fisher TL, Blenis J, Lannigan DA 1998 pp90rsk1 regulates estrogen receptor-mediated transcription through phosphorylation of Ser-167. *Mol Cell Biol* 18:1978–1984
152. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantini-dou D, Ali S, Nakshatri H 2001 Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α : a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817–9824
153. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, Holz MK 2009 S6 kinase 1 regulates estrogen receptor α in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 284:6361–6369
154. Yamnik RL, Holz MK 2010 mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor α serine 167 phosphorylation. *FEBS Lett* 584:124–128
155. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S 1999 Phosphorylation of human estrogen receptor α by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 19:1002–1015
156. Tsai HW, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shupnik MA 2004 Protein kinase A activation of estrogen receptor α transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation. *Endocrinology* 145:2730–2738
157. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, Floore A, Velds A, van't Veer L, Neeffjes J 2004 Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor α after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 5:597–605
158. Tharakan R, Lepont P, Singleton D, Kumar R, Khan S 2008 Phosphorylation of estrogen receptor α , serine residue 305 enhances activity. *Mol Cell Endocrinol* 295:70–78
159. Balasenthil S, Barnes CJ, Rayala SK, Kumar R 2004 Estrogen receptor activation at serine 305 is sufficient to up-regulate cyclin D1 in breast cancer cells. *FEBS Lett* 567:243–247
160. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R 2002 P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor- α and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J* 21:5437–5447
161. Zwart W, Griekspoor A, Berno V, Lakeman K, Jalink K, Mancini M, Neeffjes J, Michalides R 2007 PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered ori-

- entation of ER α towards co-activator SRC-1. *EMBO J* 26:3534–3544
162. Kok M, Zwart W, Holm C, Fles R, Hauptmann M, Van't Veer LJ, Wessels LF, Neeffjes J, Stål O, Linn SC, Landberg G, Michalides R 2011 PKA-induced phosphorylation of ER α at serine 305 and high PAK1 levels is associated with sensitivity to tamoxifen in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 125:1–12
 163. Barone I, Iacopetta D, Covington KR, Cui Y, Tsimelzon A, Beyer A, Andò S, Fuqua SA 2010 Phosphorylation of the mutant K303R estrogen receptor α at serine 305 affects aromatase inhibitor sensitivity. *Oncogene* 29:2404–2414
 164. Giordano C, Cui Y, Barone I, Ando S, Mancini MA, Berne V, Fuqua SA 2010 Growth factor-induced resistance to tamoxifen is associated with a mutation of estrogen receptor α and its phosphorylation at serine 305. *Breast Cancer Res Treat* 119:71–85
 165. Barone I, Cui Y, Herynk MH, Corona-Rodriguez A, Giordano C, Selever J, Beyer A, Andò S, Fuqua SA 2009 Expression of the K303R estrogen receptor- α breast cancer mutation induces resistance to an aromatase inhibitor via addiction to the PI3K/Akt kinase pathway. *Cancer Res* 69:4724–4732
 166. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguère V 1997 Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol* 11:353–365
 167. Bhat RA, Harnish DC, Stevis PE, Lyttle CR, Komm BS 1998 A novel human estrogen receptor β : identification and functional analysis of additional N-terminal amino acids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:233–240
 168. Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW 2000 Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor β . *Biochemistry* 39:11609–11620
 169. Cheng X, Hart GW 2001 Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor β : post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* 276:10570–10575
 170. Picard N, Charbonneau C, Sanchez M, Licznar A, Busson M, Lazennec G, Tremblay A 2008 Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor β . *Mol Endocrinol* 22:317–330
 171. Tremblay A, Giguère V 2001 Contribution of steroid receptor coactivator-1 and CREB binding protein in ligand-independent activity of estrogen receptor β . *J Steroid Biochem Mol Biol* 77:19–27
 172. St-Laurent V, Sanchez M, Charbonneau C, Tremblay A 2005 Selective hormone-dependent repression of estrogen receptor β by a p38-activated ErbB2/ErbB3 pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:23–37
 173. Sanchez M, Sauvé K, Picard N, Tremblay A 2007 The hormonal response of estrogen receptor β is decreased by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway via a phosphorylation-dependent release of CREB-binding protein. *J Biol Chem* 282:4830–4840
 174. Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguère V 1998 Ligand-independent activation of the estrogen receptors α and β by mutations of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res* 58:877–881
 175. Auricchio F, Di Domenico M, Migliaccio A, Castoria G, Bilancio A 1995 The role of estradiol receptor in the proliferative activity of vanadate on MCF-7 cells. *Cell Growth Differ* 6:105–113
 176. Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW 1991 Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science* 254:1636–1639
 177. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S 2004 Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18:1131–1143
 178. Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW 2010 Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert Rev Anticancer Ther* 10:935–954
 179. Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM 1999 Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98:675–686
 180. Kim MY, Hsiao SJ, Kraus WL 2001 A role for coactivators and histone acetylation in estrogen receptor α -mediated transcription initiation. *EMBO J* 20:6084–6094
 181. Kim MY, Woo EM, Chong YT, Homenko DR, Kraus WL 2006 Acetylation of estrogen receptor α by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 20:1479–1493
 182. Wang C, Fu M, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Reutens AT, Albanese C, Lisanti MP, Katzenellenbogen BS, Kato S, Hopp T, Fuqua SA, Lopez GN, Kushner PJ, Pestell RG 2001 Direct acetylation of the estrogen receptor α hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 276:18375–18383
 183. Ma Y, Fan S, Hu C, Meng Q, Fuqua SA, Pestell RG, Tomita YA, Rosen EM 2010 BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor- α . *Mol Endocrinol* 24:76–90
 184. Urbinati G, Marsaud V, Plassat V, Fattal E, Lesieur S, Renoir JM 2010 Liposomes loaded with histone deacetylase inhibitors for breast cancer therapy. *Int J Pharm* 397:184–193
 185. Duong V, Licznar A, Margueron R, Boulle N, Busson M, Lacroix M, Katzenellenbogen BS, Cavailles V, Lazennec G 2006 ER α and ER β expression and transcriptional activity are differentially regulated by HDAC inhibitors. *Oncogene* 25:1799–1806
 186. Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, Dutertre M, Smith CL, O'Malley BW, Mancini MA 2001 FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor- α is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3:15–23
 187. Reid G, Hübner MR, Métivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F 2003 Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER α on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11:695–707
 188. Nirmala PB, Thampan RV 1995 Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem Biophys Res Commun* 213:24–31
 189. Fan M, Park A, Nephew KP 2005 CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- α . *Mol Endocrinol* 19:2901–2914
 190. Duong V, Boulle N, Daujat S, Chauvet J, Bonnet S, Neel H,

- Cavallès V 2007 Differential regulation of estrogen receptor α turnover and transactivation by Mdm2 and stress-inducing agents. *Cancer Res* 67:5513–5521
191. Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N 1999 Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol* 13:1522–1534
192. Laïos I, Journé F, Nonclercq D, Vidal DS, Toillon RA, Laurent G, Leclercq G 2005 Role of the proteasome in the regulation of estrogen receptor α turnover and function in MCF-7 breast carcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:347–359
193. Zhang H, Sun L, Liang J, Yu W, Zhang Y, Wang Y, Chen Y, Li R, Sun X, Shang Y 2006 The catalytic subunit of the proteasome is engaged in the entire process of estrogen receptor-regulated transcription. *EMBO J* 25:4223–4233
194. Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F 2003 Estrogen receptor- α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751–763
195. Li L, Li Z, Howley PM, Sacks DB 2006 E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem* 281:1978–1985
196. Saji S, Okumura N, Eguchi H, Nakashima S, Suzuki A, Toi M, Nozawa Y, Saji S, Hayashi S 2001 MDM2 enhances the function of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 281:259–265
197. Nakajima A, Maruyama S, Bohgaki M, Miyajima N, Tsukiyama T, Sakuragi N, Hatakeyama S 2007 Ligand-dependent transcription of estrogen receptor α is mediated by the ubiquitin ligase EFP. *Biochem Biophys Res Commun* 357:245–251
198. Shao W, Keeton EK, McDonnell DP, Brown M 2004 Coactivator AIB1 links estrogen receptor transcriptional activity and stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11599–11604
199. El Khissiin A, Leclercq G 1999 Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett* 448:160–166
200. Long X, Nephew KP 2006 Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- α . *J Biol Chem* 281:9607–9615
201. Berry NB, Fan M, Nephew KP 2008 Estrogen receptor- α hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol* 22:1535–1551
202. Eakin CM, Maccoss MJ, Finney GL, Klevit RE 2007 Estrogen receptor α is a putative substrate for the BRCA1 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5794–5799
203. Stanisla V, Malovannaya A, Qin J, Lonard DM, O'Malley BW 2009 OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) α and affects ER α transcriptional activity. *J Biol Chem* 284:16135–16145
204. Tateishi Y, Sonoo R, Sekiya Y, Sunahara N, Kawano M, Wayama M, Hirota R, Kawabe Y, Murayama A, Kato S, Kimura K, Yanagisawa J 2006 Turning off estrogen receptor β -mediated transcription requires estrogen-dependent receptor proteolysis. *Mol Cell Biol* 26:7966–7976
205. Masuyama H, Hiramatsu Y 2004 Involvement of suppressor for Gal 1 in the ubiquitin/proteasome-mediated degradation of estrogen receptors. *J Biol Chem* 279:12020–12026
206. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, Rostan MC, Corbo L 2005 Sumoylation of the estrogen receptor α hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19:2671–2684
207. Pradhan S, Chin HG, Estève PO, Jacobsen SE 2009 SET7/9 mediated methylation of non-histone proteins in mammalian cells. *Epigenetics* 4:383–387
208. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, Peng J, Cheng X, Vertino PM 2008 Regulation of estrogen receptor α by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell* 30:336–347
209. Garbán HJ, Márquez-Garbán DC, Pietras RJ, Ignarro LJ 2005 Rapid nitric oxide-mediated S-nitrosylation of estrogen receptor: regulation of estrogen-dependent gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2632–2636
210. Cheng X, Hart GW 2000 Glycosylation of the murine estrogen receptor- α . *J Steroid Biochem Mol Biol* 75:147–158
211. Jiang MS, Hart GW 1997 A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 272:2421–2428
212. Atsriku C, Britton DJ, Held JM, Schilling B, Scott GK, Gibson BW, Benz CC, Baldwin MA 2009 Systematic mapping of posttranslational modifications in human estrogen receptor- α with emphasis on novel phosphorylation sites. *Mol Cell Proteomics* 8:467–480
213. Pietras RJ, Szego CM 1977 Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265:69–72
214. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M 2004 S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316:878–883
215. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M 2005 Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Mol Biol Cell* 16:231–237
216. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino M 2008 The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor α -palmitoylation. *Endocrinology* 149:2567–2575
217. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER 2007 A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:22278–22288
218. Marino M, Ascenzi P 2008 Membrane association of estrogen receptor α and β influences 17 β -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73:853–858
219. Galluzzo P, Caiazza F, Moreno S, Marino M 2007 Role of ER β palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation. *Endocr Relat Cancer* 14:153–167
220. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, Pagano M 1990 Phosphorylation of uterus estradiol receptor on tyrosine. *Prog Clin Biol Res* 322:133–155
221. Migliaccio A, Rotondi A, Auricchio F 1986 Estradiol receptor: phosphorylation on tyrosine in uterus and interaction with anti-phosphotyrosine antibody. *EMBO J* 5:2867–2872
222. Pietras RJ, Arboleda J, Reese DM, Wongvipat N, Pegram MD, Ramos L, Gorman CM, Parker MG, Sliwkowski MX, Slamon DJ 1995 HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 10:2435–2446
223. Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC 1995 Phos-

- phorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 *in vivo* and by src family tyrosine kinases *in vitro*. *Mol Endocrinol* 9:24–33
224. Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G 2008 Sex-steroid hormones and EGF signalling in breast and prostate cancer cells: targeting the association of Src with steroid receptors. *Steroids* 73:880–884
 225. Varricchio L, Migliaccio A, Castoria G, Yamaguchi H, de Falco A, Di Domenico M, Giovannelli P, Farrar W, Appella E, Auricchio F 2007 Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor α tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol Cancer Res* 5:1213–1221
 226. Likhite VS, Stossi F, Kim K, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA 2006 Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol* 20:3120–3132
 227. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinnasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L 2008 Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31:212–221
 228. Le Romancer M, Treilleux I, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L 2010 Methylation, a key step for non-genomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75:560–564
 229. Zhang QX, Borg A, Wolf DM, Oesterreich S, Fuqua SA 1997 An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res* 57:1244–1249
 230. Cui Y, Zhang M, Pestell R, Curran EM, Welshons WV, Fuqua SA 2004 Phosphorylation of estrogen receptor α blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res* 64:9199–9208
 231. Herynk MH, Hopp T, Cui Y, Niu A, Corona-Rodriguez A, Fuqua SA 2010 A hypersensitive estrogen receptor α mutation that alters dynamic protein interactions. *Breast Cancer Res Treat* 122:381–393
 232. Herynk MH, Parra I, Cui Y, Beyer A, Wu MF, Hilsenbeck SG, Fuqua SA 2007 Association between the estrogen receptor α A908G mutation and outcomes in invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 13:3235–3243
 233. Rayala SK, Talukder AH, Balasenthil S, Tharakan R, Barnes CJ, Wang RA, Aldaz CM, Khan S, Kumar R 2006 P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor- α activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res* 66:1694–1701
 234. Calligé M, Kieffer I, Richard-Foy H 2005 CSN5/Jab1 is involved in ligand-dependent degradation of estrogen receptor α by the proteasome. *Mol Cell Biol* 25:4349–4358
 235. Valley CC, Métivier R, Solodin NM, Fowler AM, Mashek MT, Hill L, Alarid ET 2005 Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor α N terminus. *Mol Cell Biol* 25:5417–5428
 236. Valley CC, Solodin NM, Powers GL, Ellison SJ, Alarid ET 2008 Temporal variation in estrogen receptor- α protein turnover in the presence of estrogen. *J Mol Endocrinol* 40:23–34
 237. García Pedrero JM, Del Rio B, Martínez-Campa C, Muramatsu M, Lazo PS, Ramos S 2002 Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 16:947–960
 238. Fernö M, Stål O, Baldetorp B, Hatschek T, Källström AC, Malmström P, Nordenskjöld B, Rydén S 2000 Results of two or five years of adjuvant tamoxifen correlated to steroid receptor and S-phase levels. South Sweden Breast Cancer Group, and South-East Sweden Breast Cancer Group. *Breast Cancer Res Treat* 59:69–76
 239. Henry JA, Nicholson S, Farndon JR, Westley BR, May FE 1988 Measurement of oestrogen receptor mRNA levels in human breast tumours. *Br J Cancer* 58:600–605
 240. Pichon MF, Broet P, Magdelenat H, Delarue JC, Spyrtos F, Basuyau JP, Saez S, Rallet A, Courriere P, Millon R, Asselain B 1996 Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *Br J Cancer* 73:1545–1551
 241. Bergqvist J, Elmberger G, Ohd J, Linderholm B, Bjohle J, Hellborg H, Nordgren H, Borg AL, Skoog L, Bergh J 2006 Activated ERK1/2 and phosphorylated oestrogen receptor α are associated with improved breast cancer survival in women treated with tamoxifen. *Eur J Cancer* 42:1104–1112
 242. Murphy LC, Niu Y, Snell L, Watson P 2004 Phosphoserine-118 estrogen receptor- α expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clin Cancer Res* 10:5902–5906
 243. Sarwar N, Kim JS, Jiang J, Peston D, Sinnott HD, Madden P, Gee JM, Nicholson RI, Lykkesfeldt AE, Shousha S, Coombes RC, Ali S 2006 Phosphorylation of ER α at serine 118 in primary breast cancer and in tamoxifen-resistant tumours is indicative of a complex role for ER α phosphorylation in breast cancer progression. *Endocr Relat Cancer* 13:851–861
 244. Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Kondo N, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H 2008 Low phosphorylation of estrogen receptor α (ER α) serine 118 and high phosphorylation of ER α serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 15:755–763
 245. Zoubir M, Mathieu MC, Mazouni C, Liedtke C, Corley L, Geha S, Bouaziz J, Spielmann M, Drusche F, Symmans WF, Delaloge S, Andre F 2008 Modulation of ER phosphorylation on serine 118 by endocrine therapy: a new surrogate marker for efficacy. *Ann Oncol* 19:1402–1406
 246. Jiang J, Sarwar N, Peston D, Kulinskaya E, Shousha S, Coombes RC, Ali S 2007 Phosphorylation of estrogen receptor- α at Ser167 is indicative of longer disease-free and overall survival in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 13:5769–5776
 247. Gee JM, Robertson JF, Gutteridge E, Ellis IO, Pinder SE, Rubini M, Nicholson RI 2005 Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signaling and oestrogen receptor activity in clinical breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(Suppl 1):S99–S111
 248. Kok M, Holm-Wigerup C, Hauptmann M, Michalides R, Stål O, Linn S, Landberg G 2009 Estrogen receptor- α phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 101:1725–1729
 249. Skliris GP, Nugent ZJ, Rowan BG, Penner CR, Watson PH, Murphy LC 2010 A phosphorylation code for oestrogen receptor α predicts clinical outcome to endocrine therapy in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 17:589–597
 250. Yamashita H, Nishio M, Kobayashi S, Ando Y, Sugiura H,

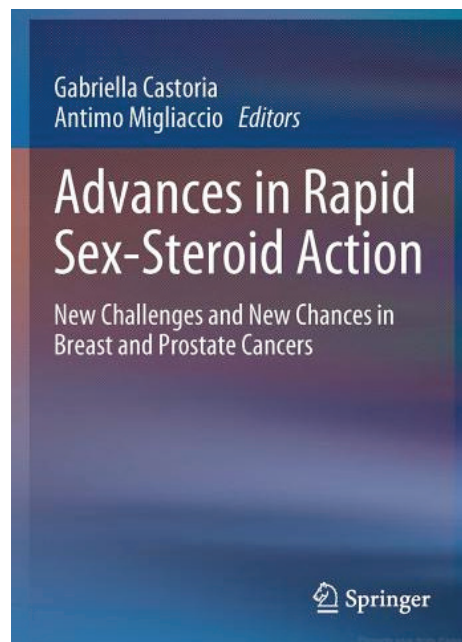
- Zhang Z, Hamaguchi M, Mita K, Fujii Y, Iwase H 2005 Phosphorylation of estrogen receptor α serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:R753–R764
251. Yamashita H, Takahashi S, Ito Y, Yamashita T, Ando Y, Toyama T, Sugiura H, Yoshimoto N, Kobayashi S, Fujii Y, Iwase H 2009 Predictors of response to exemestane as primary endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast cancer. *Cancer Sci* 100:2028–2033
252. Skliris GP, Rowan BG, Al-Dhaheri M, Williams C, Troup S, Begic S, Parisien M, Watson PH, Murphy LC 2009 Immunohistochemical validation of multiple phospho-specific epitopes for estrogen receptor α (ER α) in tissue microarrays of ER α positive human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 118:443–453
253. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Papotti M, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL, Fox SB 2009 Phosphorylated ER α , HIF-1 α , and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27:227–234
254. Miller WR, Hulme MJ, Bartlett JM, MacCallum J, Dixon JM 1997 Changes in messenger RNA expression of protein kinase A regulatory subunit α in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Clin Cancer Res* 3:2399–2404
255. Bostner J, Ahnström Waltersson M, Fornander T, Skoog L, Nordenskjöld B, Stål O 2007 Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. *Oncogene* 26:6997–7005
256. Holm C, Rayala S, Jirström K, Stål O, Kumar R, Landberg G 2006 Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 98:671–680
257. Bostner J, Skoog L, Fornander T, Nordenskjöld B, Stål O 2010 Estrogen receptor- α phosphorylation at serine 305, nuclear p21-activated kinase 1 expression, and response to tamoxifen in postmenopausal breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:1624–1633
258. Goulet I, Gauvin G, Boisvenue S, Côté J 2007 Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J Biol Chem* 282:33009–33021
259. Fuqua SA, Wiltshcke C, Zhang QX, Borg A, Castles CG, Friedrichs WE, Hopp T, Hilsenbeck S, Mohsin S, O'Connell P, Allred DC 2000 A hypersensitive estrogen receptor- α mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res* 60:4026–4029
260. Conway K, Parrish E, Edmiston SN, Tolbert D, Tse CK, Geradts J, Livasy CA, Singh H, Newman B, Millikan RC 2005 The estrogen receptor- α A908G (K303R) mutation occurs at a low frequency in invasive breast tumors: results from a population-based study. *Breast Cancer Res* 7:R871–R880
261. Hamilton-Burke W, Coleman L, Cummings M, Green CA, Holliday DL, Horgan K, Maraqa L, Peter MB, Pollock S, Shaaban AM, Smith L, Speirs V 2010 Phosphorylation of estrogen receptor β at serine 105 is associated with good prognosis in breast cancer. *Am J Pathol* 177:1079–1086
262. He X, Zheng Z, Song T, Wei C, Ma H, Ma Q, Zhang Y, Xu Y, Shi W, Ye Q, Zhong H 2010 c-Abl regulates estrogen receptor α transcription activity through its stabilization by phosphorylation. *Oncogene* 29:2238–2251
263. Chen D, Riedl T, Washbrook E, Pace PE, Coombes RC, Egly JM, Ali S 2000 Activation of estrogen receptor α by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIF and participation of CDK7. *Mol Cell* 6:127–137
264. Weitsman GE, Weebadda W, Ung K, Murphy LC 2009 Reactive oxygen species induce phosphorylation of serine 118 and 167 on estrogen receptor α . *Breast Cancer Res Treat* 118:269–279
265. Britton DJ, Scott GK, Schilling B, Atsriku C, Held JM, Gibson BW, Benz CC, Baldwin MA 2008 A novel serine phosphorylation site detected in the N-terminal domain of estrogen receptor isolated from human breast cancer cells. *J Am Soc Mass Spectrom* 19:729–740
266. Park S, Song J, Joe CO, Shin I 2008 Akt stabilizes estrogen receptor α with the concomitant reduction in its transcriptional activity. *Cell Signal* 20:1368–1374
267. Williams CC, Basu A, El-Gharbawy A, Carrier LM, Smith CL, Rowan BG 2009 Identification of four novel phosphorylation sites in estrogen receptor α : impact on receptor-dependent gene expression and phosphorylation by protein kinase CK2. *BMC Biochem* 10:36
268. Lee H, Bai W 2002 Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22:5835–5845
269. Castoria G, Migliaccio A, Green S, Di Domenico M, Chambon P, Auricchio F 1993 Properties of a purified estradiol-dependent calf uterus tyrosine kinase 1. *Biochemistry* 32:1740–1750
270. Arnold SF, Vorojeikina DP, Notides AC 1995 Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element. *J Biol Chem* 270:30205–30212
271. Arnold SF, Melamed M, Vorojeikina DP, Notides AC, Sasson S 1997 Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 11:48–53
272. Márquez DC, Lee J, Lin T, Pietras RJ 2001 Epidermal growth factor receptor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 16:73–81
273. Urbinati G, Marsaud V, Plassat V, Renoir JM 2011 Nanocarriers targeting breast cancers to deliver modulators of estrogen receptor. In: Souto EB, ed. *Lipid nanocarriers in cancer diagnosis and therapy*. Akron, Ohio: iSmithers Creative Publishing Solutions 10:279–330

B - Revue 2

Post-transcriptional Modifications of ER Alpha in Rapid Estrogen's Action

Le Romancer M, **Poulard C**, Sentis S, Corbo L.

*Extrait du livre "Advances in Rapid Sex-Steroid Action".
Springer Science. 2012.*



Post-translational Modifications of ER Alpha in Rapid Estrogen's Action

Muriel Le Romancer, Coralie Poulard,
Stéphanie Sentis and Laura Corbo

Abstract Estrogen receptor α (ER α) is a member of a large conserved superfamily of steroid hormone nuclear receptors that regulate many physiological processes, notably the growth and survival of breast tumor cells. In addition to their well-described effect on transcription, estrogens also induce rapid signaling outside of the nucleus through activation of kinase cascades. Although these effects have been extensively described, the mechanisms underlying this non-genomic function remain unclear. To fully understand how ER α functions are regulated, we must consider the role of post-translational modifications (PTMs) that modulate its activity. This review will focus particularly on PTMs regulating extranuclear signaling and on their deregulation in breast cancer. A thorough understanding of the role of these modifications in carcinogenesis might open new

M. Le Romancer · C. Poulard · S. Sentis · L. Corbo (✉)
Université de Lyon, F-69000 Lyon, France
e-mail: laura.corbo@lyon.unicancer.fr

M. Le Romancer
e-mail: muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr

C. Poulard
e-mail: coralie.poulard@lyon.unicancer.fr

S. Sentis
e-mail: stephanie.sentis@lyon.unicancer.fr

M. Le Romancer · C. Poulard · S. Sentis · L. Corbo
Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

S. Sentis
Université de Lyon 1, ISPB, 69003 Lyon, France

M. Le Romancer · C. Poulard · S. Sentis · L. Corbo
Equipe Labellisée "La Ligue", UMR INSERM 1052 - CNRS 5286
Cancer Research Center of Lyon, Centre Léon Bérard,
28 rue Laennec, 69008 Lyon, France

avenues not only for identifying new predictors of response to endocrine therapy, but also for promoting the development of novel therapeutic strategies.

Keywords Estrogen receptors α • Breast cancer • Estrogen signaling • Post-translational modifications • Arginine methylation • Palmitoylation

Abbreviations

| | |
|----------------|----------------------------------------|
| AF-1 | Activation function-1 |
| AF-2 | Activation function-2 |
| AI | aromatase inhibitor |
| E ₂ | Estrogens |
| ER | estrogen receptor |
| FAK | Focal Adhesion Kinase |
| JMJD6 | Jumonji domain-containing 6 protein |
| LBD | ligand-binding domain |
| PAT | palmitoyl acyltransferase |
| PAD | peptidylarginine deiminase |
| PI3K | phosphatidylinositol 3-kinase |
| PKA | protein kinase A |
| PLA | Proximity ligation assay |
| PRMT1 | protein arginine N methyltransferase 1 |
| PTM | post-translational modification |
| SERD | selective ER down-regulator |
| SERM | selective ER modulator |

Contents

| | | |
|---|-------------------------------------------------|----|
| 1 | Introduction..... | 80 |
| 2 | PTMs Involved in ER Non-genomic Signaling | 82 |
| | 2.1 Palmitoylation | 82 |
| | 2.2 Phosphorylation on Tyrosine (Y)..... | 84 |
| | 2.3 Arginine Methylation..... | 85 |
| 3 | Conclusions..... | 88 |
| | References..... | 90 |

1 Introduction

Estrogens (E₂) mediate a broad spectrum of physiological processes, including reproduction, cardiovascular health, bone integrity, cognition and behaviour [1] through two receptors, ER α and ER β [2], which “communicate” most of

estrogen's mitogenic and survival stimuli via direct modulation of gene expression (genomic action) [3] or via activation of signal transduction cascades (non-genomic action) [4].

ER α is responsible for many of the effects of estrogens on normal breast development. Indeed, ER α -null mice develop a rudimentary mammary gland, indicating that ER α expression is essential to mammary development [1]. The involvement of E₂ and ER α in breast cancer development and progression is based on data from both clinical and animal studies. Compelling clinical and experimental evidence has demonstrated that lifetime exposure to E₂ and to estrogenic components constitutes a major risk factor for breast cancer and promotes cancer progression by stimulating malignant cell proliferation [5].

Although in the normal breast ER α is expressed at low levels [6], 70% of breast cancers are ER α -positive [7], supporting the use of agents that suppress receptor function (anti-estrogens) or estrogen synthesis (aromatase inhibitors) for breast cancer treatment [8]. ER α is a well-established predictive marker for hormone sensitivity and a good prognostic marker in breast cancer; it helps identify tumors that are likely to respond to endocrine treatment. However, de novo or acquired resistance to these treatments develops and is associated with aggressive, hormone-independent tumor growth [9]. The metastatic potential and poorer prognosis of these resistant tumors raise the need for novel therapeutic strategies to overcome drug resistance. A focus on estrogen signaling could help understand its deregulations in patients prone to develop resistance to endocrine therapy.

The biological function of ER α is based on its ability to regulate a range of cellular functions through genomic and non-genomic mechanisms. Moreover, there is growing knowledge and understanding of rapid extra-nuclear actions of ER α . First, some reports have indicated that a subpopulation of ER α localized at or near the plasma membrane mediates ER α extra-nuclear signaling [10]. However, the identity of the receptor and its exact localization, to or close to the plasma membrane, are the subject of intense effort and debate [11–13]. Biochemical and cellular evidences indicate that membrane and nuclear forms of ER α derive from the same gene [14]. In addition, various truncated ERs have been identified as the mediators of E₂ non genomic-signaling [15, 16]. ER α receptors have no intrinsic ability to signal because they lack structural domains such as those of tyrosine kinase receptors, but they can activate multiple signal transduction cascades through direct interactions with various proteins, including the tyrosine kinase Src, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and adaptor proteins [17–21]. ER α localization to the membrane can also be mediated by interactions with the membrane adaptor protein Shc [22] and with a variety of proximal signaling molecules such as G proteins [23]. ER α interactions with Src and PI3K can also be activated by other accessory proteins such as the adaptor protein p130Cas which regulates the activation of Src kinase in T47D human breast carcinoma cells [24]. Other partners may be involved, like the caveolin-binding protein striatin which targets ER α to the plasma membrane [25]. The estradiol-dependent formation of complexes between ER α and Src or the PI3K subunit p85 activates two major pathways: the Src/ras/MAPK and the PI3K/Akt pathways. Finally, PTMs of ER α have been

described as a crucial component of non-genomic signaling, which not only triggers ER α interactions with membrane or cytoplasmic proteins but also promotes the signaling cascades.

In this review, we focus on ER α PTMs involved in non-genomic signaling, and we discuss whether deregulation of these processes can contribute to the neoplastic transformation of breast cells.

2 PTMs Involved in ER Non-genomic Signaling

Protein PTMs are highly versatile tools that regulate the activity of key proteins. PTMs include the addition of simple chemical groups, such as a phosphate, acetyl, methyl or hydroxyl groups; larger protein complexes, such as AMP, ADP-ribose, sugars or lipids; or small polypeptides, such as ubiquitin or ubiquitin-like proteins. They also include modifications of specific amino acid side chains (e.g., deamidation of glutamine residues) and the cleavage of peptide bonds (i.e., proteolysis). ER α and its coregulators are subject to a variety of covalent PTMs [26] most of which have been linked to estrogen genomic signaling. Nevertheless, a number of recent studies have also described PTMs regulating ER α non-genomic signaling, which gives new insight into this pathway. Figure 1 illustrates the PTMs involved in ER α non-genomic signaling.

2.1 Palmitoylation

To explain the rapid non-genomic effect of E₂, it has been postulated that a small population of ER α localizes to the plasma membrane, allowing its association to signal transduction molecules [10, 27, 28]. Consistently, the presence of a fraction of ER α has been reported in caveolae or caveolar-like membrane microdomains [29, 30], and more recent reports have described the involvement of post-translational lipid modifications such as palmitoylation in facilitating ER α membrane localization [31]. Palmitoylation consists of the attachment of a long fatty acyl chain, generally a C16-carbon saturated fatty acyl chain, either to cytoplasmic cysteine residues via a thioester linkage (S-palmitoylation) or to glycine/cysteine residues via an amide linkage (N-palmitoylation). S-palmitoylation, the only reversible fatty reaction, affects the lipophilicity of target proteins by changing their subcellular distribution, from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane for instance, or increasing their affinity for lipid rafts in membranes [32]. ER α has been identified as the target of S-palmitoylation mediated by an unknown palmitoyl acyltransferase (PAT) at cysteine 447, located in the human ER α ligand-binding region [31]. This site seems to be required for both the localization of ER α to the membrane and for E₂ rapid signaling. Indeed, mutation of ER α at the Cys447 residue impairs receptor membrane localization and interaction with caveolin-1 and

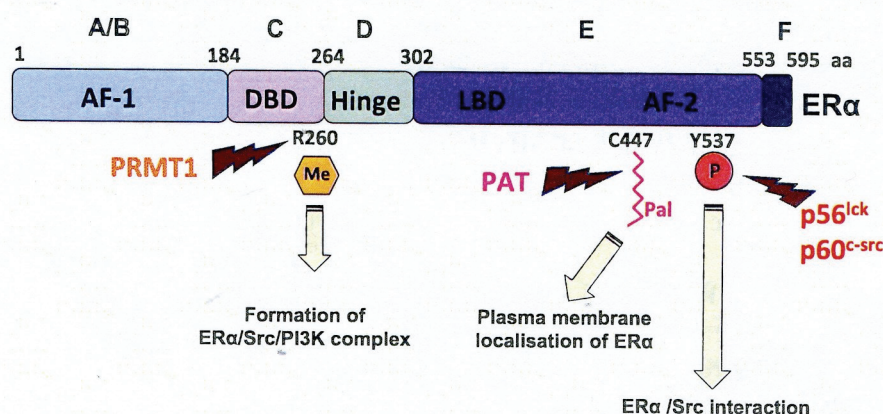


Fig. 1 Post-translational modifications of ER α involved in non-nuclear ER α signaling. Functional domains of ER α . The structure of ER α is shown in linear fashion, with the N- to C-terminal domains designated A–F. The amino acid spans of the domains are indicated. A/B domain contains the activation function 1 domain (AF-1). C domain is composed of the DNA binding domain (DBD). D domain is the Hinge region that includes nuclear localisation signals. E domain is composed of Ligand Binding Domain (LBD) and Activation function 2 (AF-2). F domain is important for the ligand specificity. Localisation of Post-translational modifications of ER α . Specific residues are modified as shown, with phosphorylation (P) in red, arginine methylation (Me) in orange and palmitoylation (Pal) in pink. Proteins responsible for these modifications are shown in matching colours

limits the E₂-induced rapid activation of the ERK/MAPK signaling pathway [22, 33]. Furthermore, inhibition of PAT activity by 2-bromopalmitate prevents ERK/MAPK and PI3K/Akt activation, thus supporting the central role of palmitoylation in rapid E₂ signaling. The group of M. Marino has shown that the plant-derived flavanone naringenin inhibits estrogen non-genomic signaling through rapid depalmitoylation of membrane-ER α [34]. The functional impact of this regulation is not currently understood. As S-palmitoylation is a reversible PTM, ER α palmitoylation can be modulated in response to cell stimulation, notably through E₂ induction. The accepted model proposes that palmitoylation triggers ER α to the plasma membrane through interaction with caveolin. Upon E₂ binding, ER α undergoes de-palmitoylation and dissociates from caveolin-1, thereby facilitating its association with signaling molecules.

Subsequent studies have identified a palmitoylation motif of nine amino acids (445–453 in ER α) including the cysteine palmitoylation site, which is highly conserved in the E domains of ER α , ER β , the progesterone receptor (PR) and the androgen receptor (AR) [35]. Recently, using a proteomic approach and conjugation to a palmitoylation motif peptide, Levin's group has shown that the heat shock protein Hsp27 interacts with the palmitoylation motif of ER α and that this protein is required for ER α palmitoylation, membrane translocation and rapid signaling [36].

In addition to the full-length classic transcript of ER α , mRNA splice variants generated through alternative splicing or alternative promoters also have membrane localization. The ER α 46 variant lacking the AF-1 domain has been identified in MCF-7 breast cancer cells [37], osteoblasts [38], human macrophages [39] and

endothelial cells [15]. It has been shown that ER α 46 is palmitoylated and that inhibitors of palmitoylation block its membrane localization in endothelial cells [15]. In breast cell lines, this variant inhibits the action of the full-length ER α [40]. Interestingly, the transfection of ER α 46 in tamoxifen-resistant breast cancer cells inhibits full-length ER α response and enhances endocrine treatment [41, 42]. However, the expression of this isoform has not been evaluated in breast tumor samples.

More recently ER α 36, a 36 kDa variant lacking both AF-1 and AF-2 domains, has been found in breast cancer cell lines [43]. This truncated form of the receptor has also been reported to localize predominantly to the plasma membrane and to the cytoplasm, but the molecular mechanism mediating this localization has not been elucidated. Wang et al. have identified three potential myristoylation sites in ER α 36 and propose that also this ER α isoform may be localized to the plasma membrane by posttranslational modification [16, 43]. This truncated ER α is also characterized by the presence of a unique 27-amino-acid region at the C-terminus, which most likely changes its ligand-binding specificity. ER α 36 inhibits the transactivation activities of wild-type ER α . Notably, it mediates membrane-initiated signaling of both estrogens and antiestrogens [16], leading to activation of the MAPK signaling pathway and cell proliferation in breast cancer cells, suggesting the involvement of ER α 36 in the development of tamoxifen-resistant breast cancer [44, 45]. Indeed patients who express high levels of ER α 36 are less likely to respond to tamoxifen treatment.

The enzymes catalyzing palmitoylation have not yet been clearly identified and very little is known about the enzymes responsible for reversing these modifications. Discovering the molecular identity of PATs has increased the interest in palmitoylation, partly because many of the genes encoding PATs have been shown to be associated with human disease, particularly with cancer [46, 47]. Notably, numerous PAT genes have been implicated in tumorigenesis and metastasis [48, 49], suggesting that the substrates of these PATs can be associated with regulatory signaling networks. The identification of these networks will potentially provide new therapeutic targets for the prevention or the reversal of cancer progression. Given that ER α is one of the few known targets of palmitoylation, particular attention will be paid to the identification of the PAT responsible for ER α modification. While some progress has been made in identifying pharmacological modulators of palmitoylation [50–52], the strategy for specifically targeting individual PATs is not known yet. From a practical standpoint, inhibiting specific PATs may be a simpler process than developing specific PAT agonists.

2.2 Phosphorylation on Tyrosine (Y)

The phosphorylation of Y537 located within the ligand-binding domain of ER α was first reported in rat uterus [53] and then confirmed in MCF-7 cells where the residue is basally phosphorylated. In vitro data indicate that Src tyrosine kinases

(p56^{lck} and p60^{c-src}) could be responsible for this phosphorylation which is necessary for ER α dimerization. Cheskis's group has confirmed that ER α interacts with the SH2 domain of Src through this phosphorylated site [54]. Research by the group of Aurrichio has recently shown interesting results demonstrating that this phosphorylation is involved in estrogen non-genomic action. A six-amino-acid peptide that mimics the sequence around the phosphoY537 residue disrupts ER α /Src interaction in MCF-7 cells, and inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation [55]. The phospho-peptide also reduces E₂ protective effect against apoptosis. Interestingly, injection of the phospho-peptide inhibits the growth of MCF-7 cell xenografts in nude mice, supporting the relevance of this strategy in vivo and confirming a potential therapeutic interest in ER α -positive tumors.

Src is a protooncogene involved in signaling that culminates in the control of multiple biological functions such as cell proliferation, cell differentiation, migration, angiogenesis and survival. Src is thought to play a key role in tumor formation and progression.

The non-receptor tyrosine kinase Src is overexpressed and activated in a large number of human malignancies and has long been associated with the development of cancer and progression to distant metastases. In recent years, in vitro observations have led to the hypothesis that, in addition to increasing cellular proliferation, one of the primary roles of Src in cancer is to regulate cell adhesion, invasion and motility [56].

Unfortunately, because of the lack of a specific antibody, the expression of phosphorylated ER α in breast tumors cannot be detected. Given the deregulation of Src activity, one could expect that ER α is hyperphosphorylated in these tumors. This could be circumvented by the use of the Proximity ligation assay (PLA) developed by Olink Bioscience to detect in situ protein interaction in fixed tissues. The study of ER α /Src interactions in breast tumors would help determine whether this pathway is deregulated in breast cancer and can be targeted by disruption of the complex. If ER α is found to be hyperphosphorylated on Y537, a possible treatment strategy could be to inhibit Src activity. The Src inhibitor dasatinib is available for clinical trials [57].

However, results from Katzenellenbogen's group strongly indicate that Src phosphorylates ER α on different other tyrosine residues, as confirmed by the fact that a truncated ER α isoform, ER α 36, triggers non-genomic signaling through Src/MAPK activation and this isoform lacks tyrosine 537, suggesting that other mechanisms are involved in ER α /Src interaction [58].

2.3 Arginine Methylation

The methylation of arginine residues is catalyzed by the protein arginine N-methyltransferase (PRMT) family of enzymes. The PRMT family comprises 10 members classified as type I or type II, depending on whether they catalyze symmetric or asymmetric dimethylation, respectively. These enzymes are involved

in different cellular processes including transcriptional regulation, DNA repair, RNA metabolism and signal transduction [59, 60]. Arginine methylation regulates these processes mainly through modifications of protein–protein interactions. Our team has reported a novel paradigm for ER α regulation through PRMT1-mediated methylation of arginine 260 within the ER α DNA-binding domain [61, 62]. Mutation of arginine 260 to alanine specifically abolishes the modification induced by PRMT1. An antibody specific to the methylated form of ER α (R260met) has been generated and used to confirm ER α methylation in living cells. A variety of consequences of ER α methylation has been described, as well as the possible underlying mechanisms. Indeed estrogen treatment induces rapid and transient methylation of ER α and this methylation event is required for mediating the extra-nuclear function of the receptor. Biochemical and cellular approaches have provided evidence that PRMT1 activation initiates the rapid estrogen action responsible for methylating ER α , which thereby interacts with Src and PI3K, and propagates the signal to downstream transduction cascades that orchestrate cell proliferation and survival. Additionally, ER α methylation seems to depend on the activation of the Src family of tyrosine kinases, as E₂-induced methylation of ER α has been shown to be reversed by the Src family tyrosine kinase inhibitors PP1 and SU6656. In line with this, we have found that the Src substrate FAK (Focal Adhesion kinase), participates in this signaling complex and that Src activity is required both for FAK interaction with Src and for the stability of the complex. Given the key role of the dual kinases Src/FAK in cell migration, we can speculate that the complex containing methylated ER α /Src/PI3K/FAK is involved in cell adhesion and migration. Rapid down-regulation of ER α methylation and/or Src activity may serve to control rapid physiological responses of estrogen, inducing the dissociation of the complex and ultimately the extinction of downstream kinase activation [61, 62].

As mentioned before, the methylation of ER α is transient after estrogen treatment, suggesting that an enzyme could remove the methyl mark. Indeed, the disappearance of the methylated receptor is not due to ER α degradation by the proteasome. So far the only enzyme reported to be able to reverse the methylation of arginine residues is JMJD6 [26], although it remains unclear whether JMJD6 is able to demethylate nonhistone proteins. Another class of enzymes capable of removing methyl marks is the peptidylarginine deiminases (PADIs), previously characterized as capable of catalyzing the conversion of arginines to citrullines by deimination which, as a consequence, prevents methylation by PRMTs [63, 64]. To date, five human PADI homologs with a relatively broad substrate specificity have been identified, PADI1-4 and PADI1-6 [65].

Immunohistochemical studies in a cohort of breast cancer patients have demonstrated that ER α is methylated in normal epithelial breast cells and is hypermethylated in a subset of breast cancer cells. Importantly, the presence or absence of methylated ER α does not correlate with the clinical classification as ER α negative or positive tumors. Actually, tumors with high levels of methylated ER α belong equally to ER α positive and negative cases. This apparent paradox is easily resolved since only tumors showing ER α nuclear staining are included in the

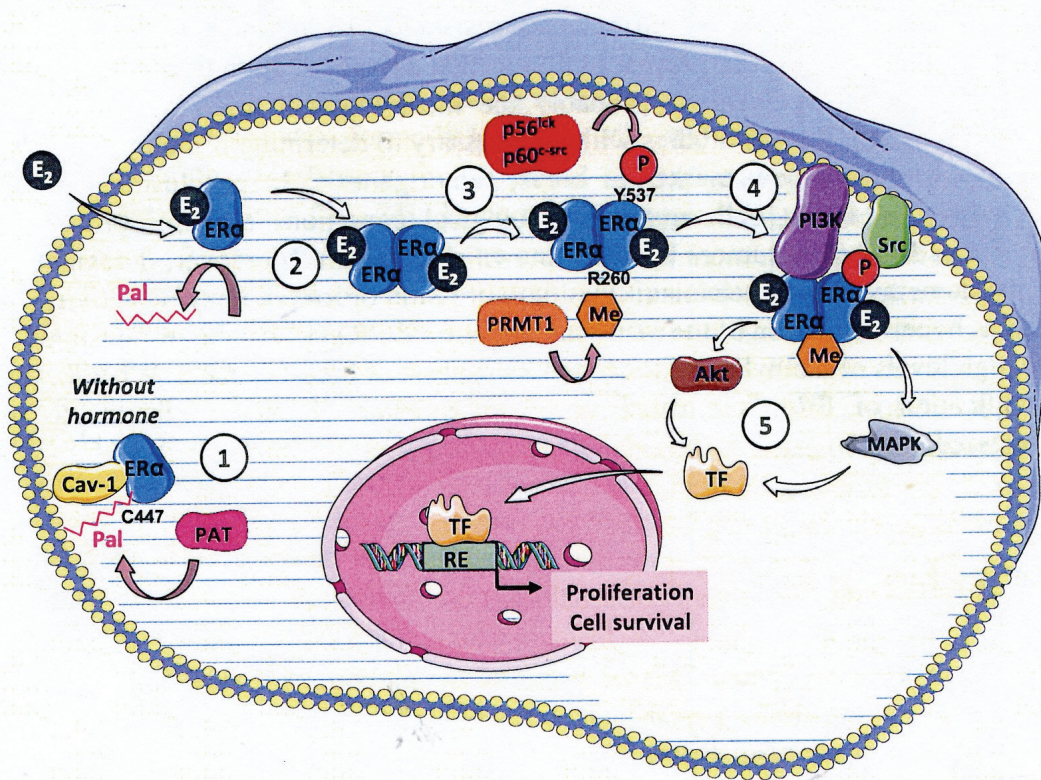


Fig. 2 Model integrating ER α post-transcriptional modifications in rapid estrogen's signaling (1) without hormone, a small population of ER α is palmitoylated on Cys447 by an unknown palmitoyltransferase (PAT) localized at the plasma membrane through caveolin-1 association (2) E₂ binding, promotes ER α depalmitoylation, dissociation from caveolin-1 and consecutive receptor dimerization; leading to (3) its methylation on the arginine 260 by PRMT1 and phosphorylation on the tyrosine 537 by p56^{lck}, p60^{c-src}. Both modifications promote (4) the formation of a signaling complex propagating the signal to downstream transduction cascades that orchestrate cell proliferation and survival (5) Indeed, methylation on R260 promotes the formation of the ER α /PI3K/Src complex and phosphorylation on Y537 is a prerequisite for the interaction between Src and ER α . It has not been established whether phosphorylation and methylation act sequentially or in concert

population of ER α -positive cases and tumors with negative or extra-nuclear expression of the receptor belong to the population of ER α -negative patients [66]. One cannot rule out that the cytoplasmic methylated form of ER α revealed by this immunohistochemical study corresponds, at least in part, to the methylated truncated forms of the receptors (ER α 46 or ER α 36) described above. Studies in progress in our laboratory, using different approaches such as PLA and real-time RT-PCR, should answer this question. Our analysis should also determine whether subgroups of breast tumors overexpressing different isoforms of methylated ER α exist. Several questions remain about the physiological role of ER α methylation, how it is regulated in breast tumors, and if a relationship exists between ER α hypermethylation and breast cancer development and/or progression. One can hypothesize that the deregulation of ER α methylation may be involved in breast

cancer development and contribute to resistance to hormone therapy. This hypothesis is supported by previous findings that hyperactivation of cellular kinase signaling, notably of Akt, is probably the most frequent alteration in human cancers [67, 68]. Further studies will be necessary to determine if methylated ER α could constitute a new marker of breast tumorigenesis. In conclusion, ER α is methylated in breast cells under physiological conditions and this process is deregulated in breast tumors by an unknown mechanism. Moreover, deregulation of the demethylation mechanism (loss of expression or loss of enzyme activity) as well as hyper-activation of the methylase activity of PRMT1 can be responsible for the high levels of methylated ER α found in a subset of breast cancers. Whether this modification of ER α is a cause or a consequence of cancer remains to be addressed.

3 Conclusions

Reversible and regulated PTMs of proteins are essential for mediating cellular responses to extracellular signals. The occurrence of several PTMs seems to be a very efficient mechanism to initiate, terminate or fine-tune the outcome of signaling pathways. While the implications of individual ER α modifications such as phosphorylation, acetylation and methylation have been relatively well-documented, interactions between the PTMs involved in ER α non-genomic signaling remain to be elucidated. We can reasonably postulate that one modification is coupled to the enhancement or suppression of another. In this context, we will discuss the potential interplays between these ER α PTMs involved in estrogen rapid action (Fig. 2). Without hormones, a small population of ER α , palmitoylated on Cys447 by an unidentified PAT, localizes at the plasma membrane through caveolin-1 association. Estrogen treatment promotes ER α depalmitoylation although an unknown mechanism, and induces its dissociation from caveolin-1 and consecutive receptor dimerization thereby leading to its methylation on the arginine 260 by PRMT1 and phosphorylation on the tyrosine 537 by p56^{lck}, p60^{c-src}. Both modifications will promote the assembly of the signaling complex which propagates the signal to downstream transduction cascades that orchestrate cell proliferation and survival. Although, as discussed before, both PRMT1 and Src activities are required for ER α methylation on R260 and for the stability of the ER α /Src/PI3K complex and that also phosphorylation on Y537 is a prerequisite for the interaction between Src and ER α ; to date we don't know whether these PTMs act sequentially or in concert. It will be interesting to test if the peptide derived from the sequence around the phosphoY537 residue, which prevents ER α /Src interaction, may inhibit ER α methylation.

At present, ER α status is the only factor used routinely for prediction of response to endocrine therapy and patient selection in breast cancer. Current breast cancer therapies can target the interaction of estrogen to its receptor by blocking the activity of ER α with drugs like tamoxifen [69] or other selective estrogen

receptor modulators (SERMs); by inducing the destabilization and degradation of ER α by treatment with selective estrogen receptor down-regulators (SERDs) such as fulvestrant (Faslodex, formerly known as ICI 182,780) [70, 71] and by reducing the production of estrogens in peripheral tissues and within the tumor using aromatase inhibitors [72, 73]. Understanding how PTMs regulate ER α actions remains a crucial goal to dissect the mechanisms by which breast cancers evade anti estrogen-mediated growth arrest and to design new anticancer strategies based on this pathway. Certainly, our knowledge of these dynamic modifications is still at an early stage due to the lack of appropriate tools to monitor modifications of endogenous proteins. It is important to note that most the effect of the described PTMs come from in vitro or transfection studies and, because of the unavailability of specific antibodies, their in vivo significance is poorly understood. It will be crucial to verify their relevance in vivo, or at least by targeted mutations in breast cell lines. This is essential, as transfection studies present intrinsic difficulties in accurately reproducing stoichiometric relationships between members of the ER α network. Future studies should investigate how the different modifications act, sequentially and/or in concert, under physiological and pathological conditions. Using proteomic approaches, including developing site- and modification-specific antibodies and employing mass spectrometry techniques, would allow a better understanding of the regulation of these dynamic modifications in vivo. Furthermore, genetic approaches, such as the creation of mice with specific mutations in individual amino acid residues that are target sites of PTMs would provide useful in testing the role of these modifications in ER α physiological functions. In addition, crosses of these modification-deficient ER α knock-in animals would help to dissect the interplay of these various PTM. While these types of approaches are often labour-intensive and relatively expensive, these models can serve as in vivo targets to test new cancer treatments and permit the generation of genetically defined cells for in vitro experiments. Important efforts should also be made to better define the actors involved in PTM regulation, notably the enzymes responsible for reversing ER α PTMs.

New treatments targeting the molecules responsible for modifying or reversing PTMs could advantageously be used in combination with endocrine therapies or after treatment failure or acquired resistance. However, specifically targeting the PTMs present in breast cancer cells is a prerequisite to reduce therapy-related risks, as most of the enzymes involved in such modifications are present in both the tumor and healthy tissues and treatment may cause a wide range of unwanted side effects.

Acknowledgments We thank M. D. Reynaud for reading the manuscript. This work was supported by the Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2009), and the Association pour la Recherche sur le Cancer. C.P. is supported by a fellowship from the French Ministry of Research. Figures were produced using Servier Medical Art.

The authors have nothing to disclose.

References

1. Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358–417
2. Enmark E, Gustafsson JA (1999) Oestrogen receptors—an overview. *J Intern Med* 246: 133–138
3. McDonnell DP, Norris JD (2002) Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296:1642–1644
4. Levin ER (2009) Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions. *J Physiol* 587:5019–5023
5. Santen RJ, Allred DC (2007) The estrogen paradox. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 496–497
6. Crandall DL, Busler DE, Novak TJ, Weber RV, Kral JG (1998) Identification of estrogen receptor beta RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 248:523–526
7. Colditz GA (1998) Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:814–823
8. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474–1481
9. Ali S, Coombes RC (2002) Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat Rev Cancer* 2:101–112
10. Pietras RJ, Szego CM (1977) Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265:69–72
11. Hammes SR, Levin ER (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev* 28:726–741
12. Olde B, Leeb-Lundberg LM (2009) GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends Endocrinol Metab* 20:409–416
13. Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptor-enriched GH(3)/B6 cells have an enhanced non-genomic response to estrogen. *Endocrine* 3:743–749
14. Levin ER (2009) Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20: 477–482
15. Li L, Haynes MP, Bender JR (2003) Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4807–4812
16. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF (2006) A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9063–9068
17. Acconcia F, Manavathi B, Mascarenhas J, Talukder AH, Mills G, Kumar R (2006) An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor alpha interaction in cell migration. *Cancer Res* 66:11030–11038
18. Bjornstrom L, Sjoberg M (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19:833–842
19. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050–6059
20. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK (2000) Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407:538–541
21. Song RX, Zhang Z, Santen RJ (2005) Estrogen rapid action via protein complex formation involving ER α and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16:347–353

22. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ (2004) The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2076–2081
23. Kumar P, Wu Q, Chambliss KL, Yuhanna IS, Mumby SM, Mineo C, Tall GG, Shaul PW (2007) Direct Interactions with G alpha i and G betagamma mediate nongenomic signaling by estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 21:1370–1380
24. Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, Defilippi P (2004) p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci* 117:1603–1611
25. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH (2004) Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:17126–17131
26. O'Malley BW, Qin J, Lanz RB (2008) Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol* 20:310–315
27. Levin ER (1999) Cellular functions of the plasma membrane estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* 10:374–377
28. Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 20:1996–2009
29. Razandi M, Oh P, Pedram A, Schnitzer J, Levin ER (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16:100–115
30. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I (1999) Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263:257–262
31. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316:878–883
32. Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH (2010) The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol* 191:1229–1238
33. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16:231–237
34. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino M (2008) The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor alpha-palmitoylation. *Endocrinology* 149:2567–2575
35. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:22278–22288
36. Razandi M, Pedram A, Levin ER (2010) Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 30:3249–3261
37. Trivedi S, Piccart M, Muquardt C, Gilot N, Hadiy S, Patel D, Leclercq G (1996) Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 40:231–241
38. Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F (2001) ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 15:2064–2077
39. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA (2009) Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS One* 4:e5539
40. Fuqua SA, Fitzgerald SD, Allred DC, Elledge RM, Nawaz Z, McDonnell DP, O'Malley BW, Greene GL, McGuire WL (1992) Inhibition of estrogen receptor action by a naturally occurring variant in human breast tumors. *Cancer Res* 52:483–486
41. Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Metivier R, Flouriot G (2005) The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474–5484

42. Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Emberts CG, McConda DB, Barry PN, Magnusen JE (2010) Estrogen receptor alpha 46 is reduced in tamoxifen resistant breast cancer cells and re-expression inhibits cell proliferation and estrogen receptor alpha 66-regulated target gene transcription. *Mol Cell Endocrinol* 323:268–276
43. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF (2005) Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* 336:1023–1027
44. Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY (2011) A positive feedback loop of ER-alpha36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30:770–780
45. Lin SL, Yan LY, Zhang XT, Yuan J, Li M, Qiao J, Wang ZY, Sun QY (2010) ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One* 5:e9013
46. Planey SL, Zacharias DA (2009) Palmitoyl acyltransferases, their substrates, and novel assays to connect them (Review). *Mol Membr Biol* 26:14–31
47. Saleem AN, Chen YH, Baek HJ, Hsiao YW, Huang HW, Kao HJ, Liu KM, Shen LF, Song IW, Tu CP, Wu JY, Kikuchi T, Justice MJ, Yen JJ, Chen YT (2010) Mice with alopecia, osteoporosis, and systemic amyloidosis due to mutation in *Zdhhc13*, a gene coding for palmitoyl acyltransferase. *PLoS Genet* 6:e1000985
48. Draper JM, Smith CD (2010) DHHC20: a human palmitoyl acyltransferase that causes cellular transformation. *Mol Membr Biol* 27:123–136
49. Planey SL, Keay SK, Zhang CO, Zacharias DA (2009) Palmitoylation of cytoskeleton associated protein 4 by DHHC2 regulates antiproliferative factor-mediated signaling. *Mol Biol Cell* 20:1454–1463
50. Jennings BC, Nadolski MJ, Ling Y, Baker MB, Harrison ML, Deschenes RJ, Linder ME (2009) 2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo[b]thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro. *J Lipid Res* 50:233–242
51. Ducker CE, Griffel LK, Smith RA, Keller SN, Zhuang Y, Xia Z, Diller JD, Smith CD (2006) Discovery and characterization of inhibitors of human palmitoyl acyltransferases. *Mol Cancer Ther* 5:1647–1659
52. Resh MD (2006) Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods* 40:191–197
53. Migliaccio A, Rotondi A, Auricchio F (1986) Estradiol receptor: phosphorylation on tyrosine in uterus and interaction with anti-phosphotyrosine antibody. *EMBO J* 5:2867–2872
54. Barletta F, Wong CW, McNally C, Komm BS, Katzenellenbogen B, Cheskis BJ (2004) Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol Endocrinol* 18:1096–1108
55. Varricchio L, Migliaccio A, Castoria G, Yamaguchi H, De FA, Di DM, Giovannelli P, Farrar W, Appella E, Auricchio F (2007) Inhibition of estradiol receptor/Src association and cell growth by an estradiol receptor alpha tyrosine-phosphorylated peptide. *Mol Cancer Res* 5:1213–1221
56. Biscardi JS, Ishizawar RC, Silva CM, Parsons SJ (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src-Src interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2:203–210
57. Burstein HJ (2011) Novel agents and future directions for refractory breast cancer. *Semin Oncol* 38(2):S17–S24
58. Likhite VS, Stossi F, Kim K, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2006) Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol* 20:3120–3132
59. Bedford MT, Clarke SG (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell* 33:1–13

60. Teyssier C, Le Romancer M, Sentis S, Jalaguier S, Corbo L, Cavailles V (2010) Protein arginine methylation in estrogen signaling and estrogen-related cancers. *Trends Endocrinol Metab* 21:181–189
61. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, Robin-Lespinasse Y, Sentis S, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Goddard S, Gobert-Gosse S, Corbo L (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 31:212–221
62. Le Romancer M, Treilleux I, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L (2010) Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75: 560–564
63. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* 306:279–283
64. Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118:545–553
65. Klose RJ, Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:307–318
66. Kim R, Kaneko M, Arihiro K, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Osaki A, Inai K (2006) Extranuclear expression of hormone receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 17: 1213–1220
67. Altomare DA, Testa JR (2005) Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24:7455–7464
68. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:988–1004
69. MacGregor JJ, Jordan VC (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50:151–196
70. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW (2000) The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell* 5:939–948
71. Wijayarathne AL, McDonnell DP (2001) The human estrogen receptor-alpha is a ubiquitinated protein whose stability is affected differentially by agonists, antagonists, and selective estrogen receptor modulators. *J Biol Chem* 276:35684–35692
72. Johnston SR, Dowsett M (2003) Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3:821–831
73. Jordan VC (2004) Aromatase inhibitors that regulate estrogen target tissues selectively? *Bone* 34:372–375

C - Revue 3

Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors

Poulard C, Bouchekioua-Bouzaghrou K, Sentis S, Corbo L, Le Romancer M.

Revue publiée dans Medecine Science en Juin 2010.

> Il apparaît de plus en plus évident que les modifications post-traductionnelles, par leur capacité à moduler de manière réversible les fonctions des protéines modifiées, sont les acteurs majeurs de la plasticité fonctionnelle des protéines. Le récepteur des œstrogènes ($ER\alpha$), largement impliqué dans le développement du cancer mammaire, est également la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles. Celles-ci modulent son activité en changeant sa localisation *via* la création de nouvelles surfaces d'interaction ou le masquage de surfaces existantes, modifiant ainsi la nature de ses partenaires. Certaines de ces modifications post-traductionnelles de $ER\alpha$ sont dérégulées dans les cancers mammaires et pourraient constituer de potentielles cibles thérapeutiques. <

Les modifications post-traductionnelles orchestrent l'action du récepteur des œstrogènes $ER\alpha$ dans les tumeurs mammaires

Coralie Poulard, Katia Bouchekioua-Bouzaghrou, Stéphanie Sentis, Laura Corbo, Muriel Le Romancer



Équipe labélisée
Ligue contre le cancer,
Inserm U590,
Centre Léon Bérard, bâtiment
Cheney D,
28, rue Laennec,
Lyon F-69008, France.
leroman@lyon.fnclcc.fr

La signalisation de $ER\alpha$

L'action des œstrogènes s'exerce *via* la liaison à leur récepteur : le récepteur des œstrogènes de type alpha ($ER\alpha$), auquel nous consacrons cette revue, et bêta ($ER\beta$). Le complexe $ER\alpha/E_2$ (E_2 désigne le 17β -œstradiol) joue un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales mammaires normales et tumorales [1]. En effet, il a été montré que les œstrogènes interviennent dans l'initiation et le développement du cancer du sein et que $ER\alpha$ est surexprimé dans plus de 70 % de ces cancers, constituant donc une cible majeure de l'hormonothérapie [2]. Toutefois, certaines patientes développent des résistances aux traitements, aussi apparaît-il important de connaître la signalisation de $ER\alpha$ dans le détail. Dans la cellule, il existe plusieurs voies de signalisation de $ER\alpha$ (Figure 1) : une voie dite génomique où $ER\alpha$, après sa liaison aux œstrogènes, se dimérise et régule la transcription des gènes cibles soit directement en se fixant sur ses éléments de réponse (voie A), soit indirectement en interagissant avec des facteurs de transcription comme AP-1 et SP-1 (voie B).

Ensuite, le recrutement de corégulateurs primaires puis secondaires permettra l'initiation de la transcription des gènes cibles de $ER\alpha$. Parallèlement à cette voie, il existe une activation de $ER\alpha$ indépendante des œstrogènes (voie C), mais dépendante d'hormones, telles que l'EGF (*epidermal growth factor*), l'IGF (*insulin growth factor*) ou la prolactine qui activent des kinases qui elles-mêmes activent $ER\alpha$, en le phosphorylant. Il existe également une voie d'activation de $ER\alpha$ appelée voie non génomique (voie D) : les œstrogènes induisent alors une réponse cellulaire très rapide qui met en jeu un *pool* de molécules $ER\alpha$ localisées près de la membrane plasmique [3]. Le complexe $ER\alpha/E_2$ interagit avec la protéine tyrosine kinase Src, la sous-unité p85 de la PI3K et d'autres protéines accessoires, formant ainsi un macrocomplexe qui entraîne l'activation de cascades de signalisation, dont celle des voies MAPK et Akt. Ces voies de signalisation régulent la prolifération cellulaire, notamment par l'activation de la transcription de gènes comme celui qui code la cycline D1 [4].

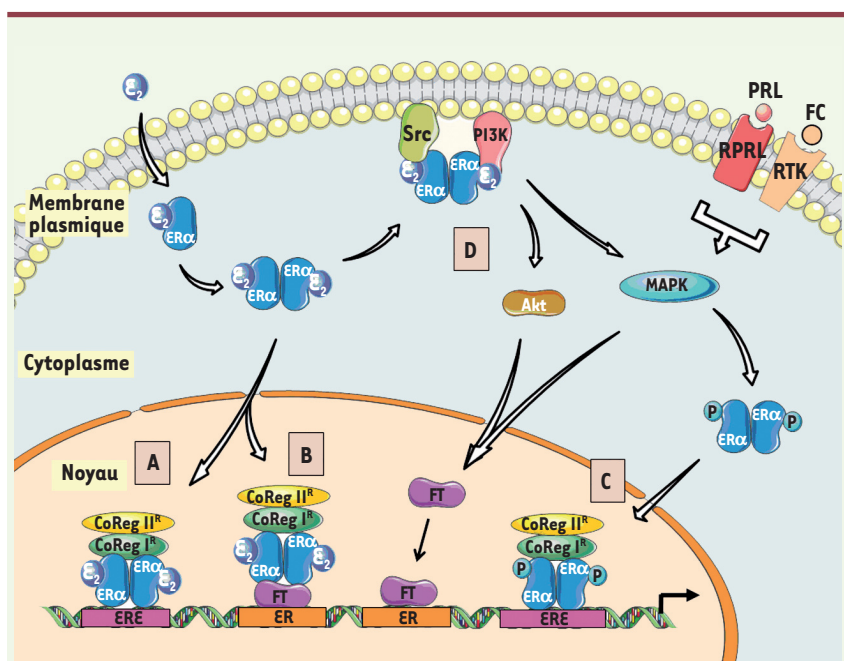


Figure 1. Les voies de signalisation de ER α . Il existe 4 voies d'action de ER α : la voie A est la voie génomique directe où ER α fixé à son ligand et dimérisé se fixe sur l'ADN au niveau de ses éléments de réponse (ERE) puis recrute des corégulateurs primaires et secondaires qui vont permettre d'activer la transcription des gènes cibles. La voie B est la voie génomique indirecte où le récepteur est un régulateur de facteur de transcription (FT). La voie C est indépendante des œstrogènes et active le récepteur par phosphorylation. La voie D est la voie non génomique où le récepteur recrute des protéine kinases qui activent différentes voies de signalisation. E $_2$: œstradiol ; ERE : éléments de réponse aux œstrogènes ; ER : éléments de réponse à d'autres facteurs de transcription ; P : phosphorylation ; RTK : récepteur à activité tyrosine kinase ; PRL : prolactine ; RPRL : récepteur de la prolactine ; CoRegI^R : corégulateurs primaires ; CoRegII^R : corégulateurs secondaires ; FT : facteur de transcription.

Nous nous proposons de répertorier les modifications post-traductionnelles de ER α et leurs fonctions ainsi que leur dérégulation dans les cancers mammaires.

Rôle des modifications post-traductionnelles de ER α dans la régulation de son activité

Modifications post-traductionnelles de ER α et voies d'activation génomique

Les phosphorylations

Les phosphorylations sont les premières modifications décrites et donc les plus étudiées (Tableau 1). ER α comporte de nombreux sites phosphorylables en réponse aux œstrogènes et à d'autres hormones ou facteurs de croissance. La sérine 118, la plus étudiée, est un site actif de régulation puisqu'elle est modifiée par de nombreuses kinases en réponse aux œstrogènes ou à d'autres facteurs. Par exemple, en réponse aux facteurs de croissance EGF et IGF-1, les MAPK induisent la phosphorylation de la sérine 118 [5]. Plus récemment, il a été montré que la prolactine induit également la phosphorylation de la sérine 118 mais la kinase impliquée n'a pas été identifiée [6]. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré que ER α phosphorylé sur la sérine 118 se localise au niveau de plusieurs promoteurs de gènes cibles, ce qui démontre clairement son rôle dans la transcription [7]. Parmi les sérines activateurs de la transcription, on distingue également la sérine 167 ainsi que les sérines 104 et 106 (Tableau 1). La sérine 305 est un site de phosphorylation pour Pak1 (*p21-activated kinase*) [8] et pour la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPc) [9]. Cette phosphorylation contribue aux fonctions transactivatrices du récepteur.

Les autres sérines phosphorylées régulent des propriétés de ER α . Par exemple, la sérine 236, phosphorylée par la PKA, joue un rôle dans la

dimérisation du récepteur [10]. En revanche, la phosphorylation basale de la tyrosine 537 régule la fixation de E $_2$ sur ER α [11]. La phosphorylation de la thréonine 311 par la p38-MAPK inhibe l'export nucléaire de ER α [12], toutes ces régulations convergeant vers la régulation de l'activité transcriptionnelle de ER α .

Les autres modifications

ER α subit également des acétylations. La protéine histone acétyltransférase p300 acétyle les lysines 299, 302, 303 et ces modifications ont un rôle répressur sur l'activité transcriptionnelle de ER α [13]. En revanche, p300 acétyle également les lysines 266 et 268 de façon E $_2$ dépendante, stimulant ainsi la liaison du récepteur à l'ADN et par conséquent son activité transcriptionnelle [14].

De nombreuses études ont montré que l'activité transcriptionnelle de ER α est également régulée par la voie de dégradation ubiquitine/protéasome. Ce n'est qu'en 2008 que les lysines 302 et 303 ont été identifiées comme des cibles de polyubiquitinylation régulant la stabilité de ER α . La polyubiquitinylation de ER α sur ces lysines joue un rôle d'activateur de l'activité transcriptionnelle de ER α œstrogéno-dépendante [15].

Bien que ER α soit dépourvu de sites consensus de sumoylation, notre équipe a montré que le récepteur était sumoylé dans la région charnière sur les lysines 266, 268, 299, 302 et 303. La sumoylation de ER α est œstrogéno-dépendante et implique les protéines E3 ligases PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT1*) et PIAS3. La sumoylation de ER α augmente son activité transcriptionnelle [16].

| Sites de phosphorylation | Activation | Kinases | Fonctions | Références |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------|
| S104-106 | ND | Cycline A/CDK2 | | [26] |
| | Œstrogènes | GSK3 | Activation de la transcription | [27] |
| S118 | Œstrogènes | - Cdk7, | | [28], |
| | Œstrogènes | - IKK α , GSK3 | | [27, 29] |
| | Œstrogènes | MAPK | Activation de la transcription | |
| | EGF et IGF-1 | ND | | [5] |
| | Prolactine | | | [6] |
| S167 | Insuline | S6K1 | Activation de la transcription | [30] |
| S236 | Absence d'œstrogènes | PKA | Inhibe la dimérisation du récepteur | [10] |
| S305 | ND | Pak1 | Activation de la transcription | [8] |
| | ND | PKA | Activation de la transcription en présence de Tam | [9] |
| T311 | Œstrogènes | p38-MAPK | Inhibe l'export nucléaire de ER α | [12] |
| Y537 | Basale | p56 ^{lck} , p60 ^{c-src} | Régule la fixation de l'E ₂ sur ER α | [11] |

Tableau I. Les sites de phosphorylation de ER α et leur fonction. ND : non déterminé ; Tam : tamoxifène ; GSK3 : *Glycogen-synthase kinase-3* ; IKK α : *I κ B kinase*.

Très récemment, il a été montré que la méthyltransférase SET7 méthyle la lysine 302 de la région charnière et stabilise le récepteur. Cette méthylation est nécessaire au recrutement de ER α au niveau des promoteurs des gènes cibles et à l'activation de la réponse transcriptionnelle induite par les œstrogènes [17]. L'ensemble de ces modifications étant réversible et très dynamique, celles-ci peuvent être un moyen de réguler l'assemblage et le désassemblage des complexes transcriptionnels liés à ER α .

Modifications post-traductionnelles de ER α dans les voies d'activation non génomique

ER α est palmitoylé dans le domaine de liaison à l'hormone sur la cystéine 447 par la palmitoyl acyl-transférase (PAT). Cette modification permet de localiser ER α à la membrane plasmique au niveau des cavéoles grâce à son interaction avec la cavéoline. La liaison des œstrogènes à ER α empêche l'action de la PAT et permet au récepteur de s'associer à d'autres protéines dans d'autres microdomaines [18].

Récemment notre équipe a montré que la méthylation de ER α sur une arginine est une étape-clé dans l'activation des voies non génomiques induites par les œstrogènes. ER α est méthylé par l'arginine méthyltransférase PRMT1 sur l'arginine 260 localisée dans le

domaine de liaison à l'ADN, et cette modification est essentielle à la formation d'un macrocomplexe qui contient ER α /Src/PI3K/FAK (*focal adhesion kinase*). La méthylation de ER α est rapide et transitoire, ce qui suggère l'existence d'une régulation fine de ce processus [19].

La cartographie des modifications post-traductionnelles de ER α montre que ces modifications sont concentrées autour de la région charnière, ce qui laisse supposer des relations entre ces différentes modifications (Figure 2 A et B).

Les interrelations entre les modifications post-traductionnelles de ER α

De plus en plus d'études révèlent des connexions entre les différentes modifications post-traductionnelles d'une protéine. Ces *crossstalks* commencent également à être décrits pour ER α . Par exemple, une relation fonctionnelle a été mise en évidence entre la phosphorylation de la sérine 305, celle de la sérine 118 et l'acétylation de la lysine 303. La mutation de la sérine 305 en acide glutamique, qui mime une phosphorylation constitutive, conduit à une augmentation de la phosphorylation de la sérine 118 et à une inhibition de l'acétylation de la lysine 303 [20]. La phosphorylation de la sérine 305 par Pak1 est donc nécessaire au maintien de la phosphorylation de la sérine 118 et à l'inhibition de l'acétylation de la lysine 303, potentialisant ainsi l'activité transcriptionnelle de ER α [21].

Récemment, il a été montré qu'un peptide de ER α acétylé sur le résidu 303 est un mauvais substrat pour la méthylation induite par

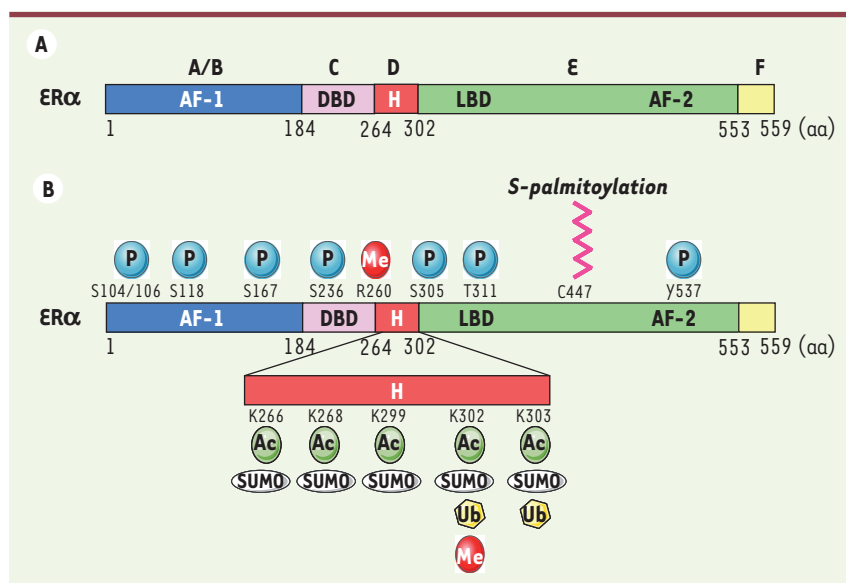


Figure 2. Les modifications post-traductionnelles de ERα. **A.** Domaines fonctionnels de ERα : le domaine A/B contient le domaine de transcription œstrogéno-indépendant : AF-1 (*activation function-1*). Le domaine C contient le domaine de liaison à l'ADN. Le domaine D est la région charnière qui contient les séquences de localisation nucléaire. Le domaine E contient le domaine de liaison du ligand (LBD) et AF-2 (*activation function 2*) qui active la transcription de façon œstrogéno-dépendante. Le domaine F joue un rôle dans la spécificité du ligand. **B.** Sites des modifications de ERα. Me : méthylation, P : phosphorylation; Ac : acétylation; Ub : ubiquitinylation; Sumo : sumoylation.

SET7 sur la lysine 302 [17]. Sachant que la méthylation sur lysine stabilise ERα, il semble donc probable que l'acétylation de la lysine 303 empêche la méthylation de ERα sur la lysine 302, déstabilisant ainsi ERα, ce qui participerait à l'effet négatif de l'acétylation de la lysine 303 sur la transcription.

L'ensemble de toutes ces modifications participe probablement à la régulation des différentes étapes du cycle transcriptionnel du récepteur ERα.

Les modifications post-traductionnelles de ERα sont dérégulées dans les tumeurs mammaires

Dans le cadre du traitement des cancers, le ciblage des modifications post-traductionnelles a déjà été entrepris. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylases dans certains cancers s'avère être une piste prometteuse [31]. Dans le cadre du cancer du sein, les voies de signalisation impliquées dans les modifications de ERα sont essentielles au maintien du fonctionnement normal de la cellule et peuvent aussi être impliquées dans le processus de tumorigénèse mammaire. Grâce à des anticorps reconnaissant spécifiquement les formes modifiées du récepteur, il a été possible de montrer que certaines formes sont surexprimées dans les cancers mammaires.

Des études ont ainsi montré que le niveau de phosphorylation de la sérine 118 de ERα augmente dans ces tumeurs. Cependant, il existe une controverse quant à la valeur pronostique de cette phosphorylation [22] qu'une étude sur une plus grande cohorte de patientes permettra probablement de trancher.

Un anticorps spécifique d'une forme de ERα méthylée sur l'arginine 260 a permis de montrer que ERα est faiblement méthylé dans les cellules épithéliales normales et hyperméthylé dans 55 % des tumeurs mammaires. Une étude pour déterminer si la méthylation de ERα peut être considérée comme un marqueur diagnostique et/ou pronostique dans les cancers du sein est en cours [19].

Une étude réalisée sur 267 tumeurs du sein invasives a montré qu'une mutation somatique dans le gène ERα (A908G), conduisant à la substitution de la lysine 303 en arginine, est présente dans 50 % des tumeurs et est associée à un mauvais pronostic. Cette mutation induit une hypersensibilité des cellules aux œstrogènes. Cela suggère que cette lysine, dont les modifications sont soumises à une très fine régulation (acétylation, sumoylation, ubiquitinylation), joue un rôle important dans la régulation de la fonction de ERα [23].

Il a aussi été montré que l'hyperexpression de formes modifiées de ERα joue un rôle dans la résistance à l'hormonothérapie. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 305 intervient dans le phénomène de résistance au tamoxifène. En effet, les tumeurs de patientes résistantes au tamoxifène sont caractérisées par une hyperactivation de la PKA et donc une hyperphosphorylation de la sérine 305. Cette phosphorylation induit un changement conformationnel du récepteur qui lui permet, en présence de tamoxifène, de s'associer avec le coactivateur SRC-1 et d'induire la transcription des gènes cibles [9, 24].

Conclusion

La régulation du protéome par des modifications post-traductionnelles est maintenant considérée comme un paramètre majeur qui contribue à la diversité structurale et fonctionnelle des mécanismes cellulaires. ERα est un bon exemple de ces mécanismes de régulation. Ces modifications interviennent à chaque étape de la régulation de ERα, que ce soit la fixation du ligand, la localisation subcellulaire, la stabilité du récepteur ou le recrutement des corégulateurs, le tout convergeant vers la régulation

de la transcription génique. Le décryptage de tous les sites modifiés et des mécanismes qui antagonisent la formation des modifications post-traductionnelles est important pour comprendre la régulation de ER α et sa dérégulation dans les cancers mammaires. La situation est en fait plus complexe puisque les corégulateurs de ER α subissent également des modifications post-traductionnelles. Par exemple, le coactivateur SRC-3 (membre de la famille p160) peut être phosphorylé, méthylé, acétylé et ubiquitinylé en réponse aux œstrogènes [25]. Les combinaisons de toutes les modifications de ER α et de ses corégulateurs permettent une fine régulation spatiotemporelle de la signalisation œstrogénique. De plus, certaines de ces modifications sont dérégulées dans la tumorigenèse mammaire et les enzymes impliquées pourraient constituer de nouvelles cibles anticancéreuses. ♦

SUMMARY

Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors

Regulation of the proteome by post-translational modifications (PTM) emerges as a major contributing factor to the functional diversity in biology regulating cellular processes. Because PTM are key to the physiologic functions of the proteins involved, it is imperative that we understand the « coding » that these modifications impart to regulate diverse activities. As estrogen signaling mediates a plethora of PTM not only on the receptors themselves but also on their coregulators, we investigate to « crack » the ER code. Besides the long-known phosphorylation, other covalent additions such as acetylation, ubiquitination, sumoylation and methylation have been described for estrogen receptors in recent years. These modifications affect receptor stability and activity, and provide potential mechanisms for cell- or-gene-specific regulation. A better understanding of the impact of these PTMs on estrogen receptor should help in the identification of new drugs for breast cancer treatments. ♦

REMERCIEMENTS

Coralie Poulard est financée par le ministère de la Recherche et Katia Bouchekioua-Bouzaghrou est financée par la Ligue nationale contre le cancer. Les illustrations ont été réalisées à partir du site internet : « Servier Medical Art ».

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 340-52.
2. Colditz GA. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998 ; 90 : 814-23.
3. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005 ; 19 : 833-42.
4. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001 ; 20 : 6050-9.
5. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995 ; 270 : 1491-4.
6. Gonzalez L, Zambrano A, Lazaro-Trueba I, et al. Activation of the unliganded estrogen receptor by prolactin in breast cancer cells. *Oncogene* 2009 ; 28 : 1298-308.

7. Weitsman GE, Li L, Skliris GP, et al. Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 10162-70.
8. Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-alpha and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J* 2002 ; 21 : 5437-47.
9. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, et al. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 597-605.
10. Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 1002-15.
11. Arnold SF, Melamed M, Vorojeikina DP, Notides AC, Sasson S. Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol* 1997 ; 11 : 48-53.
12. Lee H, Bai W. Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 5835-45.
13. Wang C, Fu M, Angeletti RH, et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 18375-83.
14. Kim MY, Woo EM, Chong YT, et al. Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol Endocrinol* 2006 ; 20 : 1479-93.
15. Berry NB, Fan M, Nephew KP. Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol Endocrinol* 2008 ; 22 : 1535-51.
16. Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, et al. Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2005 ; 19 : 2671-84.
17. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, et al. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell* 2008 ; 30 : 336-47.
18. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, et al. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 2005 ; 16 : 231-7.
19. Le Romancer M, Treilleux I, Leconte N, et al. Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell* 2008 ; 31 : 212-21.
20. Rayala SK, Talukder AH, Balasenthil S, et al. P21-activated kinase 1 regulation of estrogen receptor-alpha activation involves serine 305 activation linked with serine 118 phosphorylation. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 1694-701.
21. Cui Y, Zhang M, Pestell R, et al. Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 9199-208.
22. Murphy LC, Weitsman GE, Skliris GP, et al. Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer *in vivo*. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006 ; 102 : 139-46.
23. Herynk MH, Parra I, Cui Y. Association between the estrogen receptor alpha A908G mutation and outcomes in invasive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 3235-43.
24. Zwart W, Griekspoor A, Berno V, et al. PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERalpha towards co-activator SRC-1. *EMBO J* 2007 ; 26 : 3534-44.
25. O'Malley BW, Qin J, Lanz RB. Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol* 2008 ; 20 : 310-5.
26. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 22296-302.
27. Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, et al. Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 33006-14.
28. Chen D, Washbrook E, Sarwar N, et al. Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* 2002 ; 21 : 4921-31.
29. Park KJ, Krishnan V, O'Malley BW, Yamamoto Y, Gaynor RB. Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol Cell* 2005 ; 18 : 71-82.
30. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, et al. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem* 2009 ; 284 : 6361-9.
31. Mottet D, Castronovo V. Les histones désacétylases : nouvelles cibles pour les thérapies anti-cancéreuses. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 742-6.

TIRÉS À PART

M. Le Romancer

Références bibliographiques

- Abramovich, C., Yakobson, B., Chebath, J., and Revel, M. (1997). A protein-arginine methyltransferase binds to the intracytoplasmic domain of the IFNAR1 chain in the type I interferon receptor. *EMBO J.* *16*, 260–266.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., and Marino, M. (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 878–883.
- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V., Trentalance, A., Visca, P., and Marino, M. (2005). Palmitoylation-dependent estrogen receptor α membrane localization: regulation by 17 β -estradiol. *Mol. Biol. Cell* *16*, 231–237.
- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin. Invest.* *119*, 1438–1449.
- Agarwal, S., Zerillo, C., Kolmakova, J., Christensen, J.G., Harris, L.N., Rimm, D.L., Digiovanna, M.P., and Stern, D.F. (2009). Association of constitutively activated hepatocyte growth factor receptor (Met) with resistance to a dual EGFR/Her2 inhibitor in non-small-cell lung cancer cells. *Br. J. Cancer* *100*, 941–949.
- Aggarwal, P., Vaites, L.P., Kim, J.K., Mellert, H., Gurung, B., Nakagawa, H., Herlyn, M., Hua, X., Rustgi, A.K., McMahon, S.B., et al. (2010). Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell* *18*, 329–340.
- Ahmed, A.A., Lu, Z., Jennings, N.B., Etemadmoghadam, D., Capalbo, L., Jacamo, R.O., Barbosa-Morais, N., Le, X.-F., Vivas-Mejia, P., Lopez-Berestein, G., et al. (2010). SIK2 is a centrosome kinase required for bipolar mitotic spindle formation that provides a potential target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Cell* *18*, 109–121.
- Alessi, D.R., Sakamoto, K., and Bayascas, J.R. (2006). LKB1-dependent signaling pathways. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 137–163.
- Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M.D., et al. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 4153–4158.
- Alvarado-Kristensson, M., Rodríguez, M.J., Silió, V., Valpuesta, J.M., and Carrera, A.C. (2009). SADB phosphorylation of gamma-tubulin regulates centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1081–1092.
- Amazit, L., Pasini, L., Szafran, A.T., Berno, V., Wu, R.-C., Mielke, M., Jones, E.D., Mancini, M.G., Hinojos, C.A., O'Malley, B.W., et al. (2007). Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 6913–6932.

- Ambler, R.P., and Rees, M.W. (1959). Epsilon-N-Methyl-lysine in bacterial flagellar protein. *Nature* *184*, 56–57.
- Annunziato, A.T., Eason, M.B., and Perry, C.A. (1995). Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry* *34*, 2916–2924.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* *277*, 965–968.
- Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., and Sato, M. (2004). Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 777–783.
- Arnold, S.F., Melamed, M., Vorojeikina, D.P., Notides, A.C., and Sasson, S. (1997). Estradiol-binding mechanism and binding capacity of the human estrogen receptor is regulated by tyrosine phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* *11*, 48–53.
- Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., et al. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br. J. Cancer* *94*, 259–267.
- Arpino, G., Wiechmann, L., Osborne, C.K., and Schiff, R. (2008). Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr. Rev.* *29*, 217–233.
- Asselin-Labat, M.-L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat. Cell Biol.* *9*, 201–209.
- Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y., and Inoue, S. (2009). Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res.* *69*, 2935–2940.
- Baas, A.F., Boudeau, J., Sapkota, G.P., Smit, L., Medema, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., and Clevers, H.C. (2003). Activation of the tumour suppressor kinase LKB1 by the STE20-like pseudokinase STRAD. *EMBO J* *22*, 3062–3072.
- Bachelot, T., Bourcier, C., Cropet, C., Ray-Coquard, I., Ferrero, J.-M., Freyer, G., Abadie-Lacourtoisie, S., Eymard, J.-C., Debled, M., Spaëth, D., et al. (2012). Randomized phase II trial of everolimus in combination with tamoxifen in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer with prior exposure to aromatase inhibitors: a GINECO study. *J. Clin. Oncol.* *30*, 2718–2724.
- Bai, Y., Zhou, T., Fu, H., Sun, H., and Huang, B. (2012). 14-3-3 interacts with LKB1 via recognizing phosphorylated threonine 336 residue and suppresses LKB1 kinase function. *FEBS Lett.* *586*, 1111–1119.

- Baldwin, G.S., and Carnegie, P.R. (1971). Isolation and partial characterization of methylated arginines from the encephalitogenic basic protein of myelin. *Biochem. J.* *123*, 69–74.
- Baldwin, R.M., Morettin, A., Paris, G., Goulet, I., and Côté, J. (2012). Alternatively spliced protein arginine methyltransferase 1 isoform PRMT1v2 promotes the survival and invasiveness of breast cancer cells. *Cell Cycle* *11*, 4597–4612.
- Barletta, F., Wong, C.-W., McNally, C., Komm, B.S., Katzenellenbogen, B., and Cheskis, B.J. (2004). Characterization of the interactions of estrogen receptor and MNAR in the activation of cSrc. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1096–1108.
- Barnett, C.M. (2012). Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer. *Pharmacotherapy* *32*, 383–396.
- Barone, I., Iacopetta, D., Covington, K.R., Cui, Y., Tsimelzon, A., Beyer, A., Andò, S., and Fuqua, S.A.W. (2010). Phosphorylation of the mutant K303R estrogen receptor alpha at serine 305 affects aromatase inhibitor sensitivity. *Oncogene* *29*, 2404–2414.
- Bartell, S.M., Han, L., Kim, H., Kim, S.H., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., Chambliss, K.L., Shaul, P.W., Roberson, P.K., Weinstein, R.S., et al. (2013). Non-nuclear-initiated actions of the estrogen receptor protect cortical bone mass. *Mol. Endocrinol.* *27*, 649–656.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y.M., and Mendelsohn, J. (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* *58*, 2825–2831.
- Baselga, J., Bradbury, I., Eidtmann, H., Di Cosimo, S., de Azambuja, E., Aura, C., Gómez, H., Dinh, P., Fauria, K., Van Dooren, V., et al. (2012). Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet* *379*, 633–640.
- Beatson, G. (1896). On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma : Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet* *148*, 162–165.
- Becker, J., and Craig, E.A. (1994). Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* *219*, 11–23.
- Bedford, M.T. (2007). Arginine methylation at a glance. *J. Cell. Sci.* *120*, 4243–4246.
- Bedford, M.T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* *18*, 263–272.
- Beeram, M., Tan, Q.-T.N., Tekmal, R.R., Russell, D., Middleton, A., and DeGraffenried, L.A. (2007). Akt-induced endocrine therapy resistance is reversed by inhibition of mTOR signaling. *Ann. Oncol.* *18*, 1323–1328.
- Berns, K., Horlings, H.M., Hennessy, B.T., Madiredjo, M., Hijmans, E.M., Beelen, K., Linn, S.C., Gonzalez-Angulo, A.M., Stemke-Hale, K., Hauptmann, M., et al. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* *12*, 395–402.

- Berry, N.B., Fan, M., and Nephew, K.P. (2008). Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1535–1551.
- Bertucci, F., Borie, N., Ginestier, C., Groulet, A., Charafe-Jauffret, E., Adélaïde, J., Geneix, J., Bachelart, L., Finetti, P., Koki, A., et al. (2004). Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* **23**, 2564–2575.
- Besaçon, R., Valsesia-Wittmann, S., Puisieux, A., Caron de Fromentel, C., and Maguer-Satta, V. (2009). Cancer stem cells: the emerging challenge of drug targeting. *Curr. Med. Chem.* **16**, 394–416.
- Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* **19**, 833–842.
- Blackwell, K.L., Burstein, H.J., Storniolo, A.M., Rugo, H., Sledge, G., Koehler, M., Ellis, C., Casey, M., Vukelja, S., Bischoff, J., et al. (2010). Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1124–1130.
- Boeckel, J.-N., Guarani, V., Koyanagi, M., Roexe, T., Lengeling, A., Schermuly, R.T., Gellert, P., Braun, T., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2011). Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3276–3281.
- Boisvert, F.-M., Rhie, A., Richard, S., and Doherty, A.J. (2005). The GAR motif of 53BP1 is arginine methylated by PRMT1 and is necessary for 53BP1 DNA binding activity. *Cell Cycle* **4**, 1834–1841.
- Borun, T.W., Pearson, D., and Paik, W.K. (1972). Studies of histone methylation during the HeLa S-3 cell cycle. *J. Biol. Chem.* **247**, 4288–4298.
- Böse, J., Gruber, A.D., Helming, L., Schiebe, S., Wegener, I., Hafner, M., Beales, M., Köntgen, F., and Lengeling, A. (2004). The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J. Biol.* **3**, 15.
- Bostner, J., Skoog, L., Fornander, T., Nordenskjöld, B., and Stål, O. (2010). Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine 305, nuclear p21-activated kinase 1 expression, and response to tamoxifen in postmenopausal breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1624–1633.
- Bottaro, D.P., Rubin, J.S., Faletto, D.L., Chan, A.M., Kmieciak, T.E., Vande Woude, G.F., and Aaronson, S.A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802–804.
- Boudeau, J., Baas, A.F., Deak, M., Morrice, N.A., Kieloch, A., Schutkowski, M., Prescott, A.R., Clevers, H.C., and Alessi, D.R. (2003). MO25alpha/beta interact with STRADalpha/beta enhancing their ability to bind, activate and localize LKB1 in the cytoplasm. *EMBO J.* **22**, 5102–5114.
- Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M.F., and Alessi, D.R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *J. Cell. Sci.* **117**, 6365–6375.

- Boyd, N.F., Lockwood, G.A., Martin, L.J., Knight, J.A., Byng, J.W., Yaffe, M.J., and Tritchler, D.L. (1998). Mammographic densities and breast cancer risk. *Breast Dis* 10, 113–126.
- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S., and Clarke, S. (2001). PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 32971–32976.
- Brodie, A., and Sabnis, G. (2011). Adaptive changes result in activation of alternate signaling pathways and acquisition of resistance to aromatase inhibitors. *Clin. Cancer Res.* 17, 4208–4213.
- Brodie, A., Macedo, L., and Sabnis, G. (2010). Aromatase resistance mechanisms in model systems in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118, 283–287.
- Brostoff, S., and Eylar, E.H. (1971). Localization of methylated arginine in the A1 protein from myelin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 765–769.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753–758.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15, 2174–2183.
- Burt, R., and Neklason, D.W. (2005). Genetic testing for inherited colon cancer. *Gastroenterology* 128, 1696–1716.
- Byvoet, P., Shepherd, G.R., Hardin, J.M., and Noland, B.J. (1972). The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 148, 558–567.
- Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., Smeriglio, M., Di Stefano, P., Gippone, S., Surico, N., Silengo, L., Turco, E., Tarone, G., et al. (2004). p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J. Cell. Sci.* 117, 1603–1611.
- Campbell, R.A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N.M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001a). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* 276, 9817–9824.
- Campone, M., Bachelot, T., Gnant, M., Deleu, I., Rugo, H.S., Pistilli, B., Noguchi, S., Shtivelband, M., Pritchard, K.I., Provencher, L., et al. (2013). Effect of visceral metastases on the efficacy and safety of everolimus in postmenopausal women with advanced breast cancer: Subgroup analysis from the BOLERO-2 study. *Eur. J. Cancer.*
- Carascossa, S., Dudek, P., Cenni, B., Briand, P.-A., and Picard, D. (2010). CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev.* 24, 708–719.
- Carmeci, C., Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke, U., and Weigel, R.J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45, 607–617.

- Carpenter, K.D., and Korach, K.S. (2006). Potential biological functions emerging from the different estrogen receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1092*, 361–373.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., Egia, A., Sasaki, A.T., Thomas, G., Kozma, S.C., et al. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* *118*, 3065–3074.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 4285–4289.
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M.V., and Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* *20*, 6050–6059.
- Castoria, G., Giovannelli, P., Lombardi, M., De Rosa, C., Giraldi, T., de Falco, A., Barone, M.V., Abbondanza, C., Migliaccio, A., and Auricchio, F. (2012). Tyrosine phosphorylation of estradiol receptor by Src regulates its hormone-dependent nuclear export and cell cycle progression in breast cancer cells. *Oncogene* *31*, 4868–4877.
- Catalano, S., Barone, I., Giordano, C., Rizza, P., Qi, H., Gu, G., Malivindi, R., Bonofiglio, D., and Andò, S. (2009). Rapid estradiol/ERalpha signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1634–1645.
- Cavallès, V., Dauvois, S., L’Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* *14*, 3741–3751.
- Cavazzoni, A., Bonelli, M.A., Fumarola, C., La Monica, S., Airoud, K., Bertoni, R., Alfieri, R.R., Galetti, M., Tramonti, S., Galvani, E., et al. (2012). Overcoming acquired resistance to letrozole by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer cell clones. *Cancer Lett.* *323*, 77–87.
- Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Anderson, R.G.W., Mendelsohn, M.E., and Shaul, P.W. (2002). ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol. Endocrinol.* *16*, 938–946.
- Chambliss, K.L., Wu, Q., Oltmann, S., Konanah, E.S., Umetani, M., Korach, K.S., Thomas, G.D., Mineo, C., Yuhanna, I.S., Kim, S.H., et al. (2010). Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 2319–2330.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* *318*, 444–447.
- Charafe-Jauffret, E., Chaffanet, M., Bertucci, F., Ginestier, C., Jacquemier, J., deLapeyrière, O., and Birnbaum, D. (2007). [Towards an integrated cellular and molecular: definition of breast cancers]. *Med Sci (Paris)* *23*, 626–632.
- Chen, C., Nott, T.J., Jin, J., and Pawson, T. (2011). Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 629–642.

- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.M., Schurter, B.T., Aswad, D.W., and Stallcup, M.R. (1999a). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**, 2174–2177.
- Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C., and Ali, S. (1999b). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1002–1015.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R.M. (1999c). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* **98**, 675–686.
- Chen, D., Washbrook, E., Sarwar, N., Bates, G.J., Pace, P.E., Thirunuvakkarasu, V., Taylor, J., Epstein, R.J., Fuller-Pace, F.V., Egly, J.-M., et al. (2002). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene* **21**, 4921–4931.
- Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.-H., Dai, S., et al. (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **125**, 691–702.
- Cheng, X., and Zhang, X. (2007a). Structural dynamics of protein lysine methylation and demethylation. *Mutat. Res.* **618**, 102–115.
- Cheng, D., Côté, J., Shaaban, S., and Bedford, M.T. (2007b). The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol. Cell* **25**, 71–83.
- Cheung, W.D., Sakabe, K., Housley, M.P., Dias, W.B., and Hart, G.W. (2008). O-linked beta-N-acetylglucosaminyltransferase substrate specificity is regulated by myosin phosphatase targeting and other interacting proteins. *J. Biol. Chem.* **283**, 33935–33941.
- Chiang, G.G., and Abraham, R.T. (2007). Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* **13**, 433–442.
- Choo, A.Y., Yoon, S.-O., Kim, S.G., Roux, P.P., and Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 17414–17419.
- Chresta, C.M., Davies, B.R., Hickson, I., Harding, T., Cosulich, S., Critchlow, S.E., Vincent, J.P., Ellston, R., Jones, D., Sini, P., et al. (2010). AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* **70**, 288–298.
- Chuang, T.-W., Peng, P.-J., and Tarn, W.-Y. (2011). The exon junction complex component Y14 modulates the activity of the methylosome in biogenesis of spliceosomal small nuclear ribonucleoproteins. *J. Biol. Chem.* **286**, 8722–8728.
- Cikala, M., Alexandrova, O., David, C.N., Pröschel, M., Stiening, B., Cramer, P., and Böttger, A. (2004). The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol.* **5**, 26.
- Cintron, N.S., and Toft, D. (2006). Defining the requirements for Hsp40 and Hsp70 in the Hsp90 chaperone pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 26235–26244.

- Clarke, C.H., Norfleet, A.M., Clarke, M.S., Watson, C.S., Cunningham, K.A., and Thomas, M.L. (2000). Perimembrane localization of the estrogen receptor alpha protein in neuronal processes of cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* *71*, 34–42.
- Clarke, R.B., Howell, A., Potten, C.S., and Anderson, E. (1997). Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* *57*, 4987–4991.
- Collins, S.P., Reoma, J.L., Gamm, D.M., and Uhler, M.D. (2000). LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem. J.* *345 Pt 3*, 673–680.
- Conway, K., Parrish, E., Edmiston, S.N., Tolbert, D., Tse, C.-K., Moorman, P., Newman, B., and Millikan, R.C. (2007). Risk factors for breast cancer characterized by the estrogen receptor alpha A908G (K303R) mutation. *Breast Cancer Res.* *9*, R36.
- Cook, J.R., Lee, J.-H., Yang, Z.-H., Krause, C.D., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2006). FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 472–481.
- Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.-L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* *18*, 1533–1538.
- Cui, P., Qin, B., Liu, N., Pan, G., and Pei, D. (2004). Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp. Cell Res.* *293*, 154–163.
- Cuthbert, G.L., Daujat, S., Snowden, A.W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P.D., Tempst, P., Bannister, A.J., et al. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* *118*, 545–553.
- Dacwag, C.S., Bedford, M.T., Sif, S., and Imbalzano, A.N. (2009). Distinct protein arginine methyltransferases promote ATP-dependent chromatin remodeling function at different stages of skeletal muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1909–1921.
- Daujat, S., Bauer, U.-M., Shah, V., Turner, B., Berger, S., and Kouzarides, T. (2002). Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* *12*, 2090–2097.
- Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J. Cell. Sci.* *106 (Pt 4)*, 1377–1388.
- Davies, M.P.A., O'Neill, P.A., Innes, H., Sibson, D.R., Prime, W., Holcombe, C., and Foster, C.S. (2004). Correlation of mRNA for oestrogen receptor beta splice variants ERbeta1, ERbeta2/ERbetacx and ERbeta5 with outcome in endocrine-treated breast cancer. *J. Mol. Endocrinol.* *33*, 773–782.
- Delpuch, Y., Wu, Y., Hess, K.R., Hsu, L., Ayers, M., Natowicz, R., Coutant, C., Rouzier, R., Barranger, E., Hortobagyi, G.N., et al. (2012). Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *135*, 619–627.

- DeNardo, D.G., Kim, H.-T., Hilsenbeck, S., Cuba, V., Tsimelzon, A., and Brown, P.H. (2005). Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. *Mol. Endocrinol.* *19*, 362–378.
- DeNardo, D.G., Cuba, V.L., Kim, H., Wu, K., Lee, A.V., and Brown, P.H. (2007). Estrogen receptor DNA binding is not required for estrogen-induced breast cell growth. *Mol. Cell. Endocrinol.* *277*, 13–25.
- Dibble, C.C., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 5657–5670.
- DiRenzo, J., Shang, Y., Phelan, M., Sif, S., Myers, M., Kingston, R., and Brown, M. (2000). BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 7541–7549.
- Dowsett, M., and Ellis, M.J. (2003). Role of biologic markers in patient selection and application to disease prevention. *Am. J. Clin. Oncol.* *26*, S34–39.
- Dowsett, M., Cuzick, J., Ingle, J., Coates, A., Forbes, J., Bliss, J., Buyse, M., Baum, M., Buzdar, A., Colleoni, M., et al. (2010). Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. *J. Clin. Oncol.* *28*, 509–518.
- Drewes, G., Ebnet, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* *89*, 297–308.
- Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* *35*, 79–87.
- El Messaoudi, S., Fabbrizio, E., Rodriguez, C., Chuchana, P., Fauquier, L., Cheng, D., Theillet, C., Vandell, L., Bedford, M.T., and Sardet, C. (2006). Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 13351–13356.
- El-Andaloussi, N., Valovka, T., Toueille, M., Steinacher, R., Focke, F., Gehrig, P., Covic, M., Hassa, P.O., Schär, P., Hübscher, U., et al. (2006). Arginine methylation regulates DNA polymerase beta. *Mol. Cell* *22*, 51–62.
- Elston, C.W., Ellis, I.O., and Pinder, S.E. (1999). Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *31*, 209–223.
- Emmen, J.M.A., and Korach, K.S. (2003). Estrogen receptor knockout mice: phenotypes in the female reproductive tract. *Gynecol. Endocrinol.* *17*, 169–176.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 4258–4265.

Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J.R., Lee, J.-H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A., et al. (2002). Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* 3, 641–645.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Rose, D.M., Pearson, A., Ezekewitz, R.A., and Henson, P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90.

Fan, P., Wang, J., Santen, R.J., and Yue, W. (2007). Long-term treatment with tamoxifen facilitates translocation of estrogen receptor alpha out of the nucleus and enhances its interaction with EGFR in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 67, 1352–1360.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660–4671.

Feng, Q., Yi, P., Wong, J., and O'Malley, B.W. (2006). Signaling within a coactivator complex: methylation of SRC-3/AIB1 is a molecular switch for complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7846–7857.

Feng, Q., He, B., Jung, S.-Y., Song, Y., Qin, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B.W. (2009). Biochemical control of CARM1 enzymatic activity by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 284, 36167–36174.

Feng, Y., Wang, J., Asher, S., Hoang, L., Guardiani, C., Ivanov, I., and Zheng, Y.G. (2011). Histone H4 acetylation differentially modulates arginine methylation by an in Cis mechanism. *J. Biol. Chem.* 286, 20323–20334.

Fernando, R.I., and Wimalasena, J. (2004). Estradiol Abrogates Apoptosis in Breast Cancer Cells through Inactivation of BAD: Ras-dependent Nongenomic Pathways Requiring Signaling through ERK and Akt. *Mol. Biol. Cell* 15, 3266–3284.

Fielenbach, N., Guardavaccaro, D., Neubert, K., Chan, T., Li, D., Feng, Q., Hutter, H., Pagano, M., and Antebi, A. (2007). DRE-1: an evolutionarily conserved F box protein that regulates *C. elegans* developmental age. *Dev. Cell* 12, 443–455.

Filardo, E., Quinn, J., Pang, Y., Graeber, C., Shaw, S., Dong, J., and Thomas, P. (2007). Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148, 3236–3245.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R., Jr (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 14, 1649–1660.

Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., et al. (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat. Med.* 14, 518–527.

Fisher, B., and Fisher, E.R. (1967). Barrier function of lymph node to tumor cells and erythrocytes. I. Normal nodes. *Cancer* 20, 1907–1913.

- Flouriou, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J.* *19*, 4688–4700.
- Ford, D., Easton, D.F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., Bishop, D.T., Weber, B., Lenoir, G., Chang-Claude, J., et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 676–689.
- Fornieris, F., Binda, C., Dall'Aglio, A., Fraaije, M.W., Battaglioli, E., and Mattevi, A. (2006). A highly specific mechanism of histone H3-K4 recognition by histone demethylase LSD1. *J. Biol. Chem.* *281*, 35289–35295.
- Frankel, A., and Clarke, S. (2000). PRMT3 is a distinct member of the protein arginine N-methyltransferase family. Conferral of substrate specificity by a zinc-finger domain. *J. Biol. Chem.* *275*, 32974–32982.
- Frankel, A., Yadav, N., Lee, J., Branscombe, T.L., Clarke, S., and Bedford, M.T. (2002). The novel human protein arginine N-methyltransferase PRMT6 is a nuclear enzyme displaying unique substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *277*, 3537–3543.
- Friedenreich, C.M., Courneya, K.S., and Bryant, H.E. (2001). Influence of physical activity in different age and life periods on the risk of breast cancer. *Epidemiology* *12*, 604–612.
- Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2001). The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8289–8300.
- Frietze, S., Lupien, M., Silver, P.A., and Brown, M. (2008). CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer Res.* *68*, 301–306.
- Fritah, A., Christian, M., and Parker, M.G. (2010). The metabolic coregulator RIP140: an update. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *299*, E335–340.
- Fuqua, S.A., Wiltschke, C., Zhang, Q.X., Borg, A., Castles, C.G., Friedrichs, W.E., Hopp, T., Hilsenbeck, S., Mohsin, S., O'Connell, P., et al. (2000). A hypersensitive estrogen receptor-alpha mutation in premalignant breast lesions. *Cancer Res.* *60*, 4026–4029.
- Galien, R., and Garcia, T. (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2424–2429.
- García-Pedrero, J.M., Kiskinis, E., Parker, M.G., and Beldandia, B. (2006). The SWI/SNF chromatin remodeling subunit BAF57 is a critical regulator of estrogen receptor function in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 22656–22664.
- Gaude, H., Aznar, N., Delay, A., Bres, A., Buchet-Poyau, K., Caillat, C., Vigouroux, A., Rogon, C., Woods, A., Vanacker, J.-M., et al. (2012). Molecular chaperone complexes with antagonizing activities regulate stability and activity of the tumor suppressor LKB1. *Oncogene* *31*, 1582–1591.

Gee, J.M.W., Harper, M.E., Hutcheson, I.R., Madden, T.A., Barrow, D., Knowlden, J.M., McClelland, R.A., Jordan, N., Wakeling, A.E., and Nicholson, R.I. (2003). The anti-epidermal growth factor receptor agent gefitinib (ZD1839/Iressa) improves anti-hormone response and prevents development of resistance in breast cancer in vitro. *Endocrinology* 144, 5105–5117.

Generali, D., Buffa, F.M., Berruti, A., Brizzi, M.P., Campo, L., Bonardi, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., et al. (2009). Phosphorylated ER α , HIF-1 α , and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 227–234.

Gerber, H.-P., and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 65, 671–680.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 31, 13–20.

Ghayad, S.E., and Cohen, P.A. (2010). Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 5, 29–57.

Glade, M.J. (1999). Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition* 15, 523–526.

Gougelet, A., Bouclier, C., Marsaud, V., Maillard, S., Mueller, S.O., Korach, K.S., and Renoir, J.-M. (2005). Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 71–81.

Gougelet, A., Mueller, S.O., Korach, K.S., and Renoir, J.-M. (2007). Oestrogen receptors pathways to oestrogen responsive elements: the transactivation function-1 acts as the keystone of oestrogen receptor (ER) β -mediated transcriptional repression of ER α . *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 104, 110–122.

Goulet, I., Gauvin, G., Boisvenue, S., and Côté, J. (2007). Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 282, 33009–33021.

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134–139.

Greenblatt, R.B., Roy, S., Mahesh, V.B., Barfield, W.E., and Jungck, E.C. (1962). Induction of ovulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 84, 900–912.

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

Greger, J.G., Fursov, N., Cooch, N., McLarney, S., Freedman, L.P., Edwards, D.P., and Cheskis, B.J. (2007). Phosphorylation of MNAR promotes estrogen activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1904–1913.

Gros, L., Delaporte, C., Frey, S., Decesse, J., de Saint-Vincent, B.R., Cavarec, L., Dubart, A., Gudkov, A.V., and Jacquemin-Sablon, A. (2003). Identification of new drug sensitivity genes using genetic suppressor elements: protein arginine N-methyltransferase mediates cell sensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer Res.* *63*, 164–171.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* *346*, 340–352.

Gruver, A.M., Portier, B.P., and Tubbs, R.R. (2011). Molecular pathology of breast cancer: the journey from traditional practice toward embracing the complexity of a molecular classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *135*, 544–557.

Guan, Z., Xu, B., Desilvio, M.L., Shen, Z., Arpornwirat, W., Tong, Z., Lorvidhaya, V., Jiang, Z., Yang, J., Makhson, A., et al. (2013). Randomized Trial of Lapatinib Versus Placebo Added to Paclitaxel in the Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.*

Guderian, G., Peter, C., Wiesner, J., Sickmann, A., Schulze-Osthoff, K., Fischer, U., and Grimmler, M. (2011). RioK1, a new interactor of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), competes with pICln for binding and modulates PRMT5 complex composition and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *286*, 1976–1986.

Guedj, M., Marisa, L., de Reynies, A., Orsetti, B., Schiappa, R., Bibeau, F., MacGrogan, G., Lerebours, F., Finetti, P., Longy, M., et al. (2012). A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene* *31*, 1196–1206.

Gupta, P., Huq, M.D.M., Khan, S.A., Tsai, N.-P., and Wei, L.-N. (2005). Regulation of co-repressive activity of and HDAC recruitment to RIP140 by site-specific phosphorylation. *Mol. Cell Proteomics* *4*, 1776–1784.

Hagiwara, T., Nakashima, K., Hirano, H., Senshu, T., and Yamada, M. (2002). Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 979–983.

Hahn, P., Böse, J., Edler, S., and Lengeling, A. (2008). Genomic structure and expression of Jmjd6 and evolutionary analysis in the context of related JmjC domain containing proteins. *BMC Genomics* *9*, 293.

Hahn, P., Wegener, I., Burrells, A., Böse, J., Wolf, A., Erck, C., Butler, D., Schofield, C.J., Böttger, A., and Lengeling, A. (2010). Analysis of Jmjd6 cellular localization and testing for its involvement in histone demethylation. *PLoS ONE* *5*, e13769.

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

- Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W., Jr, Coates, R.J., Liff, J.M., Talamini, R., Chantarakul, N., et al. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br. J. Cancer* *87*, 1234–1245.
- Hammes, S.R., and Levin, E.R. (2007). Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr. Rev.* *28*, 726–741.
- Han, G., Li, J., Wang, Y., Li, X., Mao, H., Liu, Y., and Chen, C.D. (2012). The hydroxylation activity of Jmjd6 is required for its homo-oligomerization. *J. Cell. Biochem.* *113*, 1663–1670.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and Brown, M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 11540–11545.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 774–785.
- Harper-Wynne, C.L., Sacks, N.P.M., Shenton, K., MacNeill, F.A., Sauven, P., Laidlaw, I.J., Rayter, Z., Miall, S., Howes, A., Salter, J., et al. (2002). Comparison of the systemic and intratumoral effects of tamoxifen and the aromatase inhibitor vorozole in postmenopausal patients with primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *20*, 1026–1035.
- Harrington, L.S., Findlay, G.M., Gray, A., Tolkacheva, T., Wigfield, S., Rebholz, H., Barnett, J., Leslie, N.R., Cheng, S., Shepherd, P.R., et al. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* *166*, 213–223.
- Harrington, W.R., Kim, S.H., Funk, C.C., Madak-Erdogan, Z., Schiff, R., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2006). Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol. Endocrinol.* *20*, 491–502.
- Harrison, M.J., Tang, Y.H., and Dowhan, D.H. (2010). Protein arginine methyltransferase 6 regulates multiple aspects of gene expression. *Nucleic Acids Res.* *38*, 2201–2216.
- Hawkins, S.M., and Matzuk, M.M. (2008). Menstrual Cycle: Basic Biology. *Ann N Y Acad Sci* *1135*, 10–18.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* *2*, 28.
- He, X., Zheng, Z., Song, T., Wei, C., Ma, H., Ma, Q., Zhang, Y., Xu, Y., Shi, W., Ye, Q., et al. (2010). c-Abl regulates estrogen receptor alpha transcription activity through its stabilization by phosphorylation. *Oncogene* *29*, 2238–2251.
- Heller, G., Geradts, J., Ziegler, B., Newsham, I., Filipits, M., Markis-Ritzinger, E.-M., Kandioler, D., Berger, W., Stiglbauer, W., Depisch, D., et al. (2007). Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *103*, 283–291.

- Hempel, K., Lange, H.W., and Birkofer, L. (1968). [Epsilon-N-trimethyllysine, a new amino acid in histones]. *Naturwissenschaften* 55, 37.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4, 988–1004.
- Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2005). Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 715–725.
- Herrmann, F., Bossert, M., Schwander, A., Akgün, E., and Fackelmayer, F.O. (2004). Arginine methylation of scaffold attachment factor A by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle-associated PRMT1. *J. Biol. Chem.* 279, 48774–48779.
- Herrmann, F., Lee, J., Bedford, M.T., and Fackelmayer, F.O. (2005). Dynamics of human protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 38005–38010.
- Herynk, M.H., Parra, I., Cui, Y., Beyer, A., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., and Fuqua, S.A.W. (2007). Association between the estrogen receptor alpha A908G mutation and outcomes in invasive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 3235–3243.
- Higashimoto, K., Kuhn, P., Desai, D., Cheng, X., and Xu, W. (2007). Phosphorylation-mediated inactivation of coactivator-associated arginine methyltransferase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12318–12323.
- Ho, M.-C., Wilczek, C., Bonanno, J.B., Xing, L., Seznec, J., Matsui, T., Carter, L.G., Onikubo, T., Kumar, P.R., Chan, M.K., et al. (2013). Structure of the arginine methyltransferase PRMT5-MEP50 reveals a mechanism for substrate specificity. *PLoS ONE* 8, e57008.
- Hoffmann, P.R., deCathelineau, A.M., Ogden, C.A., Leverrier, Y., Bratton, D.L., Daleke, D.L., Ridley, A.J., Fadok, V.A., and Henson, P.M. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell Biol.* 155, 649–659.
- Holbro, T., Civenni, G., and Hynes, N.E. (2003). The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell Res.* 284, 99–110.
- Holtkamp, D.E., Greslin, J.G., Root, C.A., and Lerner, L.J. (1960). Gonadotrophin inhibiting and anti-fecundity effects of chloramiphen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 105, 197–201.
- Hong, X., Zang, J., White, J., Wang, C., Pan, C.-H., Zhao, R., Murphy, R.C., Dai, S., Henson, P., Kappler, J.W., et al. (2010). Interaction of JMJD6 with single-stranded RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14568–14572.
- Hopp, T.A., Weiss, H.L., Hilsenbeck, S.G., Cui, Y., Allred, D.C., Horwitz, K.B., and Fuqua, S.A.W. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin. Cancer Res.* 10, 2751–2760.
- Hoskins, J.M., Carey, L.A., and McLeod, H.L. (2009). CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 576–586.

- Hou, Z., Peng, H., Ayyanathan, K., Yan, K.-P., Langer, E.M., Longmore, G.D., and Rauscher, F.J., 3rd (2008). The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase 5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3198–3207.
- Howell, A., DeFriend, D., Robertson, J., Blamey, R., and Walton, P. (1995). Response to a specific antioestrogen (ICI 182780) in tamoxifen-resistant breast cancer. *Lancet* **345**, 29–30.
- Howell, A., DeFriend, D.J., Robertson, J.F., Blamey, R.W., Anderson, L., Anderson, E., Sutcliffe, F.A., and Walton, P. (1996). Pharmacokinetics, pharmacological and anti-tumour effects of the specific anti-oestrogen ICI 182780 in women with advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* **74**, 300–308.
- Hsu, J.-M., Chen, C.-T., Chou, C.-K., Kuo, H.-P., Li, L.-Y., Lin, C.-Y., Lee, H.-J., Wang, Y.-N., Liu, M., Liao, H.-W., et al. (2011). Crosstalk between Arg 1175 methylation and Tyr 1173 phosphorylation negatively modulates EGFR-mediated ERK activation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 174–181.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., et al. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**, 96.
- Huang, S.M., and Stallcup, M.R. (2000). Mouse Zac1, a transcriptional coactivator and repressor for nuclear receptors. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 1855–1867.
- Huang, N., vom Baur, E., Garnier, J.M., Lerouge, T., Vonesch, J.L., Lutz, Y., Chambon, P., and Losson, R. (1998). Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. *EMBO J.* **17**, 3398–3412.
- Huq, M.M., Ha, S.G., Barcelona, H., and Wei, L.-N. (2009). Lysine Methylation of Nuclear Co-repressor Receptor Interacting Protein 140. *J Proteome Res* **8**, 1156–1167.
- Huq, M.D., Gupta, P., Tsai, N.-P., White, R., Parker, M.G., and Wei, L.-N. (2006). Suppression of receptor interacting protein 140 repressive activity by protein arginine methylation. *EMBO J.* **25**, 5094–5104.
- Hutcheson, I.R., Knowlden, J.M., Madden, T.-A., Barrow, D., Gee, J.M.W., Wakeling, A.E., and Nicholson, R.I. (2003). Oestrogen receptor-mediated modulation of the EGFR/MAPK pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **81**, 81–93.
- Hyllus, D., Stein, C., Schnabel, K., Schiltz, E., Imhof, A., Dou, Y., Hsieh, J., and Bauer, U.-M. (2007). PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev.* **21**, 3369–3380.
- Jansen, M., Ten Klooster, J.P., Offerhaus, G.J., and Clevers, H. (2009). LKB1 and AMPK family signaling: the intimate link between cell polarity and energy metabolism. *Physiol. Rev.* **89**, 777–798.
- Jeng, M.H., Yue, W., Eischeid, A., Wang, J.P., and Santen, R.J. (2000). Role of MAP kinase in the enhanced cell proliferation of long term estrogen deprived human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* **62**, 167–175.

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

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080.

Jeong, K.W., Lee, Y.-H., and Stallcup, M.R. (2009). Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex to steroid hormone-regulated promoters by nuclear receptor coactivator flightless-I. *J. Biol. Chem.* 284, 29298–29309.

Jiang, J., Sarwar, N., Peston, D., Kulinskaya, E., Shousha, S., Coombes, R.C., and Ali, S. (2007). Phosphorylation of estrogen receptor-alpha at Ser167 is indicative of longer disease-free and overall survival in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 13, 5769–5776.

Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Catelli, M.G., Binart, N., Mester, J., and Baulieu, E.E. (1984). Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones. *Nature* 308, 850–853.

Johansson, L., Thomsen, J.S., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (1999). The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* 274, 345–353.

Johansson, L., Båvner, A., Thomsen, J.S., Färnegårdh, M., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (2000). The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1124–1133.

Johnson, J.L., and Toft, D.O. (1994). A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J. Biol. Chem.* 269, 24989–24993.

Johnson, J.L., and Toft, D.O. (1995). Binding of p23 and hsp90 during assembly with the progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 9, 670–678.

Johnson, M.D., Zuo, H., Lee, K.-H., Trebley, J.P., Rae, J.M., Weatherman, R.V., Desta, Z., Flockhart, D.A., and Skaar, T.C. (2004). Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. *Breast Cancer Res. Treat.* 85, 151–159.

Johnston, S.R., Sacconi-Jotti, G., Smith, I.E., Salter, J., Newby, J., Coppen, M., Ebbs, S.R., and Dowsett, M. (1995). Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res.* 55, 3331–3338.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293.

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

Jordan, V.C., and Morrow, M. (1994). Should clinicians be concerned about the carcinogenic potential of tamoxifen? *Eur. J. Cancer* 30A, 1714–1721.

Jordan, N.J., Gee, J.M.W., Barrow, D., Wakeling, A.E., and Nicholson, R.I. (2004). Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *87*, 167–180.

Junttila, T.T., Akita, R.W., Parsons, K., Fields, C., Lewis Phillips, G.D., Friedman, L.S., Sampath, D., and Sliwkowski, M.X. (2009). Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* *15*, 429–440.

Kakimoto, Y., and Akazawa, S. (1970). Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *J. Biol. Chem.* *245*, 5751–5758.

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

Karkhanis, V., Hu, Y.-J., Baiocchi, R.A., Imbalzano, A.N., and Sif, S. (2011). Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 633–641.

Karkhanis, V., Wang, L., Tae, S., Hu, Y.-J., Imbalzano, A.N., and Sif, S. (2012). Protein arginine methyltransferase 7 regulates cellular response to DNA damage by methylating promoter histones H2A and H4 of the polymerase δ catalytic subunit gene, POLD1. *J. Biol. Chem.* *287*, 29801–29814.

Kataoka, Y., Mukohara, T., Shimada, H., Saijo, N., Hirai, M., and Minami, H. (2010). Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Ann. Oncol.* *21*, 255–262.

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

Katsanis, N., Yaspo, M.L., and Fisher, E.M. (1997). Identification and mapping of a novel human gene, HRMT1L1, homologous to the rat protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) gene. *Mamm. Genome* *8*, 526–529.

Katz, J.E., Dlakić, M., and Clarke, S. (2003). Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol. Cell Proteomics* *2*, 525–540.

Kearney, P.L., Bhatia, M., Jones, N.G., Yuan, L., Glascock, M.C., Catchings, K.L., Yamada, M., and Thompson, P.R. (2005). Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry* *44*, 10570–10582.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* *2*, 133–140.

Kim, S., and Paik, W.K. (1965). Studies on the origin of epsilon-N-methyl-L-lysine in protein. *J. Biol. Chem.* *240*, 4629–4634.

- Kim, J.H., Yang, C.K., Heo, K., Roeder, R.G., An, W., and Stallcup, M.R. (2008). CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Mol. Cell* *31*, 510–519.
- Kim, M.Y., Woo, E.M., Chong, Y.T.E., Homenko, D.R., and Kraus, W.L. (2006). Acetylation of estrogen receptor alpha by p300 at lysines 266 and 268 enhances the deoxyribonucleic acid binding and transactivation activities of the receptor. *Mol. Endocrinol.* *20*, 1479–1493.
- Kim, S., Benoiton, L., and Paik, W.K. (1964). Epsilon-alkyllysine. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* *239*, 3790–3796.
- Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000). Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Res.* *60*, 3384–3388.
- Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* *29*, 2905–2919.
- Knowlden, J.M., Hutcheson, I.R., Jones, H.E., Madden, T., Gee, J.M.W., Harper, M.E., Barrow, D., Wakeling, A.E., and Nicholson, R.I. (2003). Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* *144*, 1032–1044.
- Knowlden, J.M., Hutcheson, I.R., Barrow, D., Gee, J.M.W., and Nicholson, R.I. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor signaling in tamoxifen-resistant breast cancer: a supporting role to the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* *146*, 4609–4618.
- Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D.F., and Koide, S. (2007). Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. *Mol. Endocrinol.* *21*, 829–842.
- Kok, M., Holm-Wigerup, C., Hauptmann, M., Michalides, R., Stål, O., Linn, S., and Landberg, G. (2009). Estrogen receptor-alpha phosphorylation at serine-118 and tamoxifen response in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *101*, 1725–1729.
- Kok, M., Zwart, W., Holm, C., Fles, R., Hauptmann, M., Van't Veer, L.J., Wessels, L.F.A., Neefjes, J., Stål, O., Linn, S.C., et al. (2011). PKA-induced phosphorylation of ER α at serine 305 and high PAK1 levels is associated with sensitivity to tamoxifen in ER-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *125*, 1–12.
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* *15*, 2057–2063.
- Kouros-Mehr, H., Slorach, E.M., Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2006). GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* *127*, 1041–1055.
- Kowanetz, M., Lönn, P., Vanlandewijck, M., Kowanetz, K., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2008). TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J. Cell Biol.* *182*, 655–662.

- Kraus, W.L., and Kadonaga, J.T. (1998). p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev.* *12*, 331–342.
- Krause, C.D., Yang, Z.-H., Kim, Y.-S., Lee, J.-H., Cook, J.R., and Pestka, S. (2007). Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* *113*, 50–87.
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., and Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 15677–15682.
- Kuhn, P., Chumanov, R., Wang, Y., Ge, Y., Burgess, R.R., and Xu, W. (2011). Automethylation of CARM1 allows coupling of transcription and mRNA splicing. *Nucleic Acids Res.* *39*, 2717–2726.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 5925–5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., and Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* *139*, 4252–4263.
- Kumar, R., Wang, R.-A., Mazumdar, A., Talukder, A.H., Mandal, M., Yang, Z., Bagheri-Yarmand, R., Sahin, A., Hortobagyi, G., Adam, L., et al. (2002). A naturally occurring MTA1 variant sequesters oestrogen receptor-alpha in the cytoplasm. *Nature* *418*, 654–657.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* *51*, 941–951.
- Kunisaki, Y., Masuko, S., Noda, M., Inayoshi, A., Sanui, T., Harada, M., Sasazuki, T., and Fukui, Y. (2004). Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. *Blood* *103*, 3362–3364.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *74*, 311–317.
- Kuukasjärvi, T., Kononen, J., Helin, H., Holli, K., and Isola, J. (1996). Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J. Clin. Oncol.* *14*, 2584–2589.
- Lacroix, M., El Messaoudi, S., Rodier, G., Le Cam, A., Sardet, C., and Fabrizio, E. (2008). The histone-binding protein COPR5 is required for nuclear functions of the protein arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* *9*, 452–458.
- Lakowski, T.M., and Frankel, A. (2009). Kinetic analysis of human protein arginine N-methyltransferase 2: formation of monomethyl- and asymmetric dimethyl-arginine residues on histone H4. *Biochem. J.* *421*, 253–261.
- Lamond, A.I., and Spector, D.L. (2003). Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 605–612.

Lan, F., Cacicedo, J.M., Ruderman, N., and Ido, Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* *283*, 27628–27635.

Lannigan, D.A. (2003). Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids* *68*, 1–9.

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

Layde, P.M., Webster, L.A., Baughman, A.L., Wingo, P.A., Rubin, G.L., and Ory, H.W. (1989). The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *J Clin Epidemiol* *42*, 963–973.

Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., and Vignon, F. (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* *142*, 4120–4130.

Lee, H., and Bai, W. (2002). Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5835–5845.

Lee, J., Sayegh, J., Daniel, J., Clarke, S., and Bedford, M.T. (2005a). PRMT8, a new membrane-bound tissue-specific member of the protein arginine methyltransferase family. *J. Biol. Chem.* *280*, 32890–32896.

Lee, J.-H., Cook, J.R., Yang, Z.-H., Mirochnitchenko, O., Gunderson, S.I., Felix, A.M., Herth, N., Hoffmann, R., and Pestka, S. (2005b). PRMT7, a new protein arginine methyltransferase that synthesizes symmetric dimethylarginine. *J. Biol. Chem.* *280*, 3656–3664.

Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005c). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* *437*, 432–435.

Lee, Y.-H., Coonrod, S.A., Kraus, W.L., Jelinek, M.A., and Stallcup, M.R. (2005d). Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 3611–3616.

Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008). ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res.* *28*, 479–483.

Lee, M.G., Wynder, C., Bochar, D.A., Hakimi, M.-A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2006). Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6395–6402.

Lee, Y.F., Miller, L.D., Chan, X.B., Black, M.A., Pang, B., Ong, C.W., Salto-Tellez, M., Liu, E.T., and Desai, K.V. (2012). JMJD6 is a driver of cellular proliferation and motility and a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* *14*, R85.

Leers, J., Treuter, E., and Gustafsson, J.A. (1998). Mechanistic principles in NR box-dependent interaction between nuclear hormone receptors and the coactivator TIF2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6001–6013.

- Lei, N., Zhang, X., Chen, H., Wang, Y., Zhan, Y., Zheng, Z., Shen, Y., and Wu, Q. (2009). A feedback regulatory loop between methyltransferase PRMT1 and orphan receptor TR3. *Nucleic Acids Res.* *37*, 832–848.
- Lerner, L.J., and Jordan, V.C. (1990). Development of antiestrogens and their use in breast cancer: eighth Cain memorial award lecture. *Cancer Res.* *50*, 4177–4189.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* *246*, 1306–1309.
- Levin, E.R. (2009). G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator? *Endocrinology* *150*, 1563–1565.
- Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R. (2003a). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4807–4812.
- Li, M.O., Sarkisian, M.R., Mehal, W.Z., Rakic, P., and Flavell, R.A. (2003b). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* *302*, 1560–1563.
- Lieber, T., Kidd, S., Alcamo, E., Corbin, V., and Young, M.W. (1993). Antineurogenic phenotypes induced by truncated Notch proteins indicate a role in signal transduction and may point to a novel function for Notch in nuclei. *Genes Dev.* *7*, 1949–1965.
- Likhite, V.S., Stossi, F., Kim, K., Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (2006). Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol. Endocrinol.* *20*, 3120–3132.
- Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* *271*, 15034–15044.
- Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., et al. (2011). JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* *19*, 283–294.
- Liu, K., Guo, Y., Liu, H., Bian, C., Lam, R., Liu, Y., Mackenzie, F., Rojas, L.A., Reinberg, D., Bedford, M.T., et al. (2012a). Crystal structure of TDRD3 and methyl-arginine binding characterization of TDRD3, SMN and SPF30. *PLoS ONE* *7*, e30375.
- Liu, L., Siu, F.-M., Che, C.-M., Xu, A., and Wang, Y. (2012b). Akt blocks the tumor suppressor activity of LKB1 by promoting phosphorylation-dependent nuclear retention through 14-3-3 proteins. *Am J Transl Res* *4*, 175–186.
- Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J.* *23*, 833–843.

Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Bernard, P., and Boisseau, M.R. (1991). Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* *12*, 42–49.

Di Lorenzo, A., and Bedford, M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS Lett.* *585*, 2024–2031.

Lu, Q., Pallas, D.C., Surks, H.K., Baur, W.E., Mendelsohn, M.E., and Karas, R.H. (2004). Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 17126–17131.

Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., and Pollak, M. (2001). Insulin-like growth factor-1 receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J. Natl. Cancer Inst.* *93*, 1852–1857.

Mackay, A., Weigelt, B., Grigoriadis, A., Kreike, B., Natrajan, R., A'Hern, R., Tan, D.S.P., Dowsett, M., Ashworth, A., and Reis-Filho, J.S. (2011). Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. *J. Natl. Cancer Inst.* *103*, 662–673.

Madak-Erdogan, Z., Kieser, K.J., Kim, S.H., Komm, B., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (2008). Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* *22*, 2116–2127.

Maggiolini, M., and Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.* *204*, 105–114.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A.M., Picard, D., and Andò, S. (2004). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *279*, 27008–27016.

Mallappa, C., Hu, Y.-J., Shamulailatpam, P., Tae, S., Sif, S., and Imbalzano, A.N. (2011). The expression of myogenic microRNAs indirectly requires protein arginine methyltransferase (Prmt)5 but directly requires Prmt4. *Nucleic Acids Res.* *39*, 1243–1255.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* *129*, 1261–1274.

Mantri, M., Krojer, T., Bagg, E.A., Webby, C.A., Butler, D.S., Kochan, G., Kavanagh, K.L., Oppermann, U., McDonough, M.A., and Schofield, C.J. (2010). Crystal Structure of the 2-Oxoglutarate- and Fe(II)-Dependent Lysyl Hydroxylase JMJD6. *J. Mol. Biol.*

Mantri, M., Loik, N.D., Hamed, R.B., Claridge, T.D.W., McCullagh, J.S.O., and Schofield, C.J. (2011). The 2-oxoglutarate-dependent oxygenase JMJD6 catalyses oxidation of lysine residues to give 5S-hydroxylysine residues. *Chembiochem* *12*, 531–534.

Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., de Cremoux, P., de Plater, L., Guyader, C., De Pinieux, G., Judde, J.-G., et al. (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin. Cancer Res.* *13*, 3989–3998.

- Margariti, N., Fox, S.B., Bottini, A., and Generali, D. (2011). "Overcoming breast cancer drug resistance with mTOR inhibitors". Could it be a myth or a real possibility in the short-term future? *Breast Cancer Res. Treat.* *128*, 599–606.
- Marsaud, V., Gougelet, A., Maillard, S., and Renoir, J.-M. (2003). Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* *17*, 2013–2027.
- Martin, G., Ostareck-Lederer, A., Chari, A., Neuenkirchen, N., Dettwiler, S., Blank, D., Rügsegger, U., Fischer, U., and Keller, W. (2010). Arginine methylation in subunits of mammalian pre-mRNA cleavage factor I. *RNA* *16*, 1646–1659.
- Mayer, E.L., and Krop, I.E. (2010). Advances in targeting SRC in the treatment of breast cancer and other solid malignancies. *Clin. Cancer Res.* *16*, 3526–3532.
- McCarthy, A., Lord, C.J., Savage, K., Grigoriadis, A., Smith, D.P., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2009). Conditional deletion of the *Lkb1* gene in the mouse mammary gland induces tumour formation. *J. Pathol.* *219*, 306–316.
- McCave, E.J., Cass, C.A.P., Burg, K.J.L., and Booth, B.W. (2010). The normal microenvironment directs mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *15*, 291–299.
- McClelland, R.A., Barrow, D., Madden, T.A., Dutkowski, C.M., Pamment, J., Knowlden, J.M., Gee, J.M., and Nicholson, R.I. (2001). Enhanced epidermal growth factor receptor signaling in MCF7 breast cancer cells after long-term culture in the presence of the pure antiestrogen ICI 182,780 (Faslodex). *Endocrinology* *142*, 2776–2788.
- McDonnell, D.P., and Norris, J.D. (2002). Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* *296*, 1642–1644.
- Medunjanin, S., Hermani, A., De Servi, B., Grisouard, J., Rincke, G., and Mayer, D. (2005). Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J. Biol. Chem.* *280*, 33006–33014.
- Melchior, F. (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 591–626.
- Menasce, L.P., White, G.R., Harrison, C.J., and Boyle, J.M. (1993). Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics* *17*, 263–265.
- Métivier, R., Penot, G., Hübner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* *115*, 751–763.
- Metzger, D., White, J.H., and Chambon, P. (1988). The human oestrogen receptor functions in yeast. *Nature* *334*, 31–36.
- Michalides, R., Griekspoor, A., Balkenende, A., Verwoerd, D., Janssen, L., Jalink, K., Floore, A., Velds, A., van't Veer, L., and Neefjes, J. (2004). Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* *5*, 597–605.

Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M.V., Ametrano, D., Zannini, M.S., Abbondanza, C., et al. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* *19*, 5406–5417.

Miller, L.D., Smeds, J., George, J., Vega, V.B., Vergara, L., Ploner, A., Pawitan, Y., Hall, P., Klaar, S., Liu, E.T., et al. (2005). An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 13550–13555.

Miranda, T.B., Miranda, M., Frankel, A., and Clarke, S. (2004). PRMT7 is a member of the protein arginine methyltransferase family with a distinct substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *279*, 22902–22907.

Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., and Willson, T.M. (1998). Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 75–78.

Morales, D.E., McGowan, K.A., Grant, D.S., Maheshwari, S., Bhartiya, D., Cid, M.C., Kleinman, H.K., and Schnaper, H.W. (1995). Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* *91*, 755–763.

Morén, A., Raja, E., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2011). Negative regulation of TGF β signaling by the kinase LKB1 and the scaffolding protein LIP1. *J. Biol. Chem.* *286*, 341–353.

Mottet, D., and Castronovo, V. (2010). Histone deacetylases: anti-angiogenic targets in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* *10*, 898–913.

Murphy, L.C., Niu, Y., Snell, L., and Watson, P. (2004). Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha expression is associated with better disease outcome in women treated with tamoxifen. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5902–5906.

Murray, K. (1964). The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* *3*, 10–15.

Naeem, H., Cheng, D., Zhao, Q., Underhill, C., Tini, M., Bedford, M.T., and Torchia, J. (2007). The activity and stability of the transcriptional coactivator p/CIP/SRC-3 are regulated by CARM1-dependent methylation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 120–134.

Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* *6*, 117–127.

Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., Kapanen, A.I., Carraway, K.L., Isola, J., and Jovin, T.M. (2005). Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* *65*, 473–482.

Nahta, R., Yuan, L.X.H., Zhang, B., Kobayashi, R., and Esteva, F.J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 11118–11128.

- Najbauer, J., Johnson, B.A., Young, A.L., and Aswad, D.W. (1993). Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J. Biol. Chem.* *268*, 10501–10509.
- Nakashima, K., Hagiwara, T., and Yamada, M. (2002). Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem.* *277*, 49562–49568.
- Nath-Sain, S., and Marignani, P.A. (2009). LKB1 catalytic activity contributes to estrogen receptor alpha signaling. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2785–2795.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Dennis, A.P., Smith, C.L., and O'Malley, B.W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 1858–1862.
- Nezu, J., Oku, A., and Shimane, M. (1999). Loss of cytoplasmic retention ability of mutant LKB1 found in Peutz-Jeghers syndrome patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 750–755.
- Nkondjock, A., and Ghadirian, P. (2005). [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. *Med Sci (Paris)* *21*, 175–180.
- Norfleet, A.M., Thomas, M.L., Gametchu, B., and Watson, C.S. (1999). Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* *140*, 3805–3814.
- Normanno, N., Ciardiello, F., Brandt, R., and Salomon, D.S. (1994). Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *29*, 11–27.
- O'Hara, J., Vareslija, D., McBryan, J., Bane, F., Tibbitts, P., Byrne, C., Conroy, R.M., Hao, Y., Gaora, P.Ó., Hill, A.D.K., et al. (2012). AIB1:ER α transcriptional activity is selectively enhanced in aromatase inhibitor-resistant breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* *18*, 3305–3315.
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* *18*, 1859–1875.
- O'Malley, B.W., Qin, J., and Lanz, R.B. (2008). Cracking the coregulator codes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 310–315.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* *19*, 3159–3167.
- Ordóñez-Morán, P., and Muñoz, A. (2009). Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* *8*, 1675–1680.
- Osborne, C.K., Bardou, V., Hopp, T.A., Chamness, G.C., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A.W., Wong, J., Allred, D.C., Clark, G.M., and Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 353–361.

- Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreassen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., et al. (2009). GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice. *Biol. Reprod.* *80*, 34–41.
- Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C., and Ali, S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 25832–25838.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* *277*, 1508–1510.
- Paganini-Hill, A., Dworsky, R., and Krauss, R.M. (1996). Hormone replacement therapy, hormone levels, and lipoprotein cholesterol concentrations in elderly women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *174*, 897–902.
- Paik, W.K., and Kim, S. (1968). Protein methylase I. Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* *243*, 2108–2114.
- Paik, W.K., and Kim, S. (1973). Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *51*, 781–788.
- Pak, M.L., Lakowski, T.M., Thomas, D., Vhuiyan, M.I., Hüsecken, K., and Frankel, A. (2011). A protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) and 2 heteromeric interaction increases PRMT1 enzymatic activity. *Biochemistry* *50*, 8226–8240.
- Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. (2004). Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9630–9645.
- Pal, S., Baiocchi, R.A., Byrd, J.C., Grever, M.R., Jacob, S.T., and Sif, S. (2007). Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J.* *26*, 3558–3569.
- Pan, X., Zhou, T., Tai, Y.-H., Wang, C., Zhao, J., Cao, Y., Chen, Y., Zhang, P.-J., Yu, M., Zhen, C., et al. (2011). Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Med.* *17*, 708–714.
- Pandey, D.P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., and Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J.* *28*, 523–532.
- Pappas, T.C., Gametchu, B., and Watson, C.S. (1995). Membrane estrogen receptor-enriched GH(3)/B6 cells have an enhanced non-genomic response to estrogen. *Endocrine* *3*, 743–749.
- Park, K.-J., Krishnan, V., O'Malley, B.W., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (2005). Formation of an IKKalpha-dependent transcription complex is required for estrogen receptor-mediated gene activation. *Mol. Cell* *18*, 71–82.

- Park, S.H., Gammon, S.R., Knippers, J.D., Paulsen, S.R., Rubink, D.S., and Winder, W.W. (2002). Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J. Appl. Physiol.* *92*, 2475–2482.
- Parl, F.F. (2003). Multiple mechanisms of estrogen receptor gene repression contribute to ER-negative breast cancer. *Pharmacogenomics J.* *3*, 251–253.
- Parmar, H., and Cunha, G.R. (2004). Epithelial-stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. *Endocr. Relat. Cancer* *11*, 437–458.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., and Ruley, H.E. (2000). Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4859–4869.
- Pedram, A., Razandi, M., and Levin, E.R. (2006). Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol. Endocrinol.* *20*, 1996–2009.
- Pedram, A., Razandi, M., Evinger, A.J., Lee, E., and Levin, E.R. (2009a). Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3374–3389.
- Pedram, A., Razandi, M., Kim, J.K., O’Mahony, F., Lee, E.Y., Luderer, U., and Levin, E.R. (2009b). Developmental phenotype of a membrane only estrogen receptor alpha (MOER) mouse. *J. Biol. Chem.* *284*, 3488–3495.
- Pedram, A., Razandi, M., O’Mahony, F., Harvey, H., Harvey, B.J., and Levin, E.R. (2013). Estrogen reduces lipid content in the liver exclusively from membrane receptor signaling. *Sci Signal* *6*, ra36.
- Pegram, M.D., Konecny, G., and Slamon, D.J. (2000). The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat. Res.* *103*, 57–75.
- Penot, G., Le Péron, C., Mérot, Y., Grimaud-Fanouillère, E., Ferrière, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Métivier, R., et al. (2005). The human estrogen receptor-alpha isoform hERalpha46 antagonizes the proliferative influence of hERalpha66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* *146*, 5474–5484.
- Perou, C.M. (2010). Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist* *15 Suppl 5*, 39–48.
- Perou, C.M., Sørli, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Pharoah, P.D., Day, N.E., Duffy, S., Easton, D.F., and Ponder, B.A. (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* *71*, 800–809.
- Picard, D. (2006). Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* *17*, 229–235.
- Picard, D., Salser, S.J., and Yamamoto, K.R. (1988). A movable and regulable inactivation function within the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor. *Cell* *54*, 1073–1080.

- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 503–533.
- Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* *265*, 69–72.
- Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L., and Pestka, S. (1999). The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* *274*, 31531–31542.
- Ponglikitmongkol, M., Green, S., and Chambon, P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *The EMBO Journal* *7*, 3385.
- Popov, V.M., Wang, C., Shirley, L.A., Rosenberg, A., Li, S., Nevalainen, M., Fu, M., and Pestell, R.G. (2007). The functional significance of nuclear receptor acetylation. *Steroids* *72*, 221–230.
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., and Safe, S. (1997). Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* *11*, 1569–1580.
- Poulard, C., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Sentis, S., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2010). [Post-translational modifications modulate estrogen receptor alpha activity in breast tumors]. *Med Sci (Paris)* *26*, 636–640.
- Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard-Léon, S., Chabaud, S., Trédan, O., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2012). Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol Med* *4*, 1200–1213.
- Powers, M.A., Fay, M.M., Factor, R.E., Welm, A.L., and Ullman, K.S. (2011). Protein arginine methyltransferase 5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death 4. *Cancer Res.* *71*, 5579–5587.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* *228*, 111–133.
- Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* *57*, 4593–4599.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular “clamp” via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* *19*, 4383–4392.
- Prossnitz, E.R., and Maggiolini, M. (2009). Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Mol. Cell. Endocrinol.* *308*, 32–38.
- Purcell, D.J., Jeong, K.W., Bittencourt, D., Gerke, D.S., and Stallcup, M.R. (2011). A distinct mechanism for coactivator versus corepressor function by histone methyltransferase G9a in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 41963–41971.
- Qanungo, S., Haldar, S., and Basu, A. (2003). Restoration of silenced Peutz-Jeghers syndrome gene, LKB1, induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells. *Neoplasia* *5*, 367–374.

- Qi, C., Chang, J., Zhu, Y., Yeldandi, A.V., Rao, S.M., and Zhu, Y.-J. (2002). Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.* *277*, 28624–28630.
- Rakha, E.A., and Ellis, I.O. (2011). Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv Anat Pathol* *18*, 255–267.
- Ratajczak, T., and Carrello, A. (1996). Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J. Biol. Chem.* *271*, 2961–2965.
- Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* *20*, 6322–6330.
- Razandi, M., Oh, P., Pedram, A., Schnitzer, J., and Levin, E.R. (2002). ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol. Endocrinol.* *16*, 100–115.
- Razandi, M., Alton, G., Pedram, A., Ghonshani, S., Webb, P., and Levin, E.R. (2003). Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1633–1646.
- Reid, G., Hübner, M.R., Métivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol. Cell* *11*, 695–707.
- Ren, J., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Bao, S., and Xu, Z. (2010). Methylation of ribosomal protein S10 by protein-arginine methyltransferase 5 regulates ribosome biogenesis. *J. Biol. Chem.* *285*, 12695–12705.
- Renoir, J.M., Radanyi, C., Faber, L.E., and Baulieu, E.E. (1990). The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J. Biol. Chem.* *265*, 10740–10745.
- Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* *307*, 1625–1630.
- Reyal, F., Guyader, C., Decraene, C., Lucchesi, C., Auger, N., Assayag, F., De Plater, L., Gentien, D., Poupon, M.-F., Cottu, P., et al. (2012). Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res.* *14*, R11.
- Reyal, F., Hajage, D., Savignoni, A., Feron, J.-G., Bollet, M.A., Kirova, Y., Fourquet, A., Pierga, J.-Y., Cottu, P., Dieras, V., et al. (2013). Long-Term Prognostic Performance of Ki67 Rate in Early Stage, pT1-pT2, pN0, Invasive Breast Carcinoma. *PLoS ONE* *8*, e55901.
- Rho, J., Choi, S., Seong, Y.R., Cho, W.K., Kim, S.H., and Im, D.S. (2001). Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J. Biol. Chem.* *276*, 11393–11401.

Richardson, A.L., Wang, Z.C., De Nicolo, A., Lu, X., Brown, M., Miron, A., Liao, X., Iglehart, J.D., Livingston, D.M., and Ganesan, S. (2006). X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9, 121–132.

Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Kolytcheff, C., Rostan, M.-C., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2007). hCAF1, a new regulator of PRMT1-dependent arginine methylation. *J. Cell. Sci.* 120, 638–647.

Roe, S.M., Prodromou, C., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W., and Pearl, L.H. (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J. Med. Chem.* 42, 260–266.

Rogatsky, I., Luecke, H.F., Leitman, D.C., and Yamamoto, K.R. (2002). Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 16701–16706.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol. Cell* 31, 212–221.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Sentis, S., and Corbo, L. (2010). Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors. *Steroids* 75, 560–564.

Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.* 32, 597–622.

Le Romancer, M., Poulard, C., Sentis, S. and Corbo, L. (2012). Post-translational modifications of ER alpha in rapid estrogen's action. extrait du livre *Advances in rapid sex-steroid action*. Castoria G and Miglioaccio A. 79-93.

Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20, 1405–1428.

Rudland, P.S., Fernig, D.G., and Smith, J.A. (1995). Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomed. Pharmacother.* 49, 389–399.

Ruff, M., Gangloff, M., Wurtz, J.M., and Moras, D. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res.* 2, 353–359.

Rusnak, D.W., Affleck, K., Cockerill, S.G., Stubberfield, C., Harris, R., Page, M., Smith, K.J., Guntrip, S.B., Carter, M.C., Shaw, R.J., et al. (2001a). The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res.* 61, 7196–7203.

Rusnak, D.W., Lackey, K., Affleck, K., Wood, E.R., Alligood, K.J., Rhodes, N., Keith, B.R., Murray, D.M., Knight, W.B., Mullin, R.J., et al. (2001b). The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 1, 85–94.

Sabbah, M., Radanyi, C., Redeuilh, G., and Baulieu, E.E. (1996). The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem. J.* *314* (Pt 1), 205–213.

Sáez, R., Molina, M.A., Ramsey, E.E., Rojo, F., Keenan, E.J., Albanell, J., Lluch, A., García-Conde, J., Baselga, J., and Clinton, G.M. (2006). p95HER-2 predicts worse outcome in patients with HER-2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 424–431.

Sakabe, K., and Hart, G.W. (2010). O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J. Biol. Chem.* *285*, 34460–34468.

Sakamaki, J., Daitoku, H., Ueno, K., Hagiwara, A., Yamagata, K., and Fukamizu, A. (2011). Arginine methylation of BCL-2 antagonist of cell death (BAD) counteracts its phosphorylation and inactivation by Akt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 6085–6090.

Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J., and Pratt, W.B. (1985). Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J. Biol. Chem.* *260*, 12398–12401.

Santen, R.J., Fan, P., Zhang, Z., Bao, Y., Song, R.X.-D., and Yue, W. (2009). Estrogen signals via an extra-nuclear pathway involving IGF-1R and EGFR in tamoxifen-sensitive and -resistant breast cancer cells. *Steroids* *74*, 586–594.

Sapkota, G.P., Kieloch, A., Lizcano, J.M., Lain, S., Arthur, J.S., Williams, M.R., Morrice, N., Deak, M., and Alessi, D.R. (2001). Phosphorylation of the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome, LKB1/STK11, at Ser431 by p90(RSK) and cAMP-dependent protein kinase, but not its farnesylation at Cys(433), is essential for LKB1 to suppress cell growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 19469–19482.

Sapkota, G.P., Boudeau, J., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., and Alessi, D.R. (2002). Identification and characterization of four novel phosphorylation sites (Ser31, Ser325, Thr336 and Thr366) on LKB1/STK11, the protein kinase mutated in Peutz-Jeghers cancer syndrome. *Biochem. J.* *362*, 481–490.

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

Sayegh, J., Webb, K., Cheng, D., Bedford, M.T., and Clarke, S.G. (2007). Regulation of protein arginine methyltransferase 8 (PRMT8) activity by its N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* *282*, 36444–36453.

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., et al. (2007). Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *99*, 628–638.

Scott, G.K., Robles, R., Park, J.W., Montgomery, P.A., Daniel, J., Holmes, W.E., Lee, J., Keller, G.A., Li, W.L., and Fendly, B.M. (1993). A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by

alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2247–2257.

Sebbagh, M., Santoni, M.-J., Hall, B., Borg, J.-P., and Schwartz, M.A. (2009). Regulation of LKB1/STRAD localization and function by E-cadherin. *Curr Biol* **19**, 37–42.

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

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

Shattuck, D.L., Miller, J.K., Carraway, K.L., 3rd, and Sweeney, C. (2008). Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 1471–1477.

Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91–99.

Sheeler, C.Q., Singleton, D.W., and Khan, S.A. (2003). Mutation of serines 104, 106, and 118 inhibits dimerization of the human estrogen receptor in yeast. *Endocr. Res.* **29**, 237–255.

Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2009). Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3423–3429.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941–953.

Shi, Y.-J., Matson, C., Lan, F., Iwase, S., Baba, T., and Shi, Y. (2005). Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol. Cell* **19**, 857–864.

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

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

Simpson, E.R., and Dowsett, M. (2002). Aromatase and its inhibitors: significance for breast cancer therapy. *Recent Prog. Horm. Res.* **57**, 317–338.

Sims, R.J., 3rd, Rojas, L.A., Beck, D., Bonasio, R., Schüller, R., Drury, W.J., 3rd, Eick, D., and Reinberg, D. (2011). The C-terminal domain of RNA polymerase II is modified by site-specific methylation. *Science* **332**, 99–103.

Singh, M., Popowicz, G.M., Krajewski, M., and Holak, T.A. (2007). Structural ramification for acetyl-lysine recognition by the bromodomain of human BRG1 protein, a central ATPase of the SWI/SNF remodeling complex. *Chembiochem* 8, 1308–1316.

Singh, V., Miranda, T.B., Jiang, W., Frankel, A., Roemer, M.E., Robb, V.A., Gutmann, D.H., Herschman, H.R., Clarke, S., and Newsham, I.F. (2004). DAL-1/4.1B tumor suppressor interacts with protein arginine N-methyltransferase 3 (PRMT3) and inhibits its ability to methylate substrates in vitro and in vivo. *Oncogene* 23, 7761–7771.

Skliris, G.P., Leygue, E., Curtis-Snell, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2006). Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br. J. Cancer* 95, 616–626.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., and Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707–712.

Smith, C.L., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11, 657–666.

Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstråle, K., Leuchowius, K.-J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.-G., et al. (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat. Methods* 3, 995–1000.

Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., and Santen, R.J. (2004). The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor α to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2076–2081.

Song, R.X.-D., McPherson, R.A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., and Santen, R.J. (2002). Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol. Endocrinol.* 16, 116–127.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10869–10874.

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

Spyridopoulos, I., Sullivan, A.B., Kearney, M., Isner, J.M., and Losordo, D.W. (1997). Estrogen-receptor-mediated inhibition of human endothelial cell apoptosis. Estradiol as a survival factor. *Circulation* 95, 1505–1514.

Stearns, V., Johnson, M.D., Rae, J.M., Morocho, A., Novielli, A., Bhargava, P., Hayes, D.F., Desta, Z., and Flockhart, D.A. (2003). Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after

coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1758–1764.

Steeg, P.S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat. Med.* 12, 895–904.

Stephen, R.L., Shaw, L.E., Larsen, C., Corcoran, D., and Darbre, P.D. (2001). Insulin-like growth factor receptor levels are regulated by cell density and by long term estrogen deprivation in MCF7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276, 40080–40086.

Stoica, A., Saceda, M., Doraiswamy, V.L., Coleman, C., and Martin, M.B. (2000). Regulation of estrogen receptor- α gene expression by epidermal growth factor. *J. Endocrinol.* 165, 371–378.

Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D.R., Collins, R.E., Sharma, D., Peng, J., Cheng, X., and Vertino, P.M. (2008). Regulation of estrogen receptor α by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol. Cell* 30, 336–347.

Sweeney, E.E., McDaniel, R.E., Maximov, P.Y., Fan, P., and Jordan, V.C. (2012). Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress Despite Limitations. *Horm Mol Biol Clin Investig* 9, 143–163.

Swiercz, R., Person, M.D., and Bedford, M.T. (2005). Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3). *Biochem. J.* 386, 85–91.

Swiercz, R., Cheng, D., Kim, D., and Bedford, M.T. (2007). Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 282, 16917–16923.

Tagami, T., Madison, L.D., Nagaya, T., and Jameson, J.L. (1997). Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2642–2648.

Tai, P.K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N.G., Duhring, J.L., and Faber, L.E. (1986). A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, androgen, and glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 25, 5269–5275.

Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1998). PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 273, 16935–16945.

Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., and Herschman, H.R. (2000). PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7723–7730.

Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O., and Caldas, C. (2007). An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol.* 8, R157.

Teyssier, C., Chen, D., and Stallcup, M.R. (2002). Requirement for multiple domains of the protein arginine methyltransferase CARM1 in its transcriptional coactivator function. *J. Biol. Chem.* 277, 46066–46072.

- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., and Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* *146*, 624–632.
- Thomassen, M., Tan, Q., and Kruse, T.A. (2009). Gene expression meta-analysis identifies chromosomal regions and candidate genes involved in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res. Treat.* *113*, 239–249.
- Tiainen, M., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T.P. (1999). Growth suppression by Lkb1 is mediated by a G(1) cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 9248–9251.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T.P. (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1497–1504.
- Toft, D., and Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *55*, 1574–1581.
- Tripsianes, K., Madl, T., Machyna, M., Fessas, D., Englbrecht, C., Fischer, U., Neugebauer, K.M., and Sattler, M. (2011). Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1414–1420.
- Trivedi, S., Piccart, M., Muquardt, C., Gilot, N., Hadiy, S., Patel, D., and Leclercq, G. (1996). Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* *40*, 231–241.
- Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2006). Purification of histone demethylases from HeLa cells. *Methods* *40*, 318–326.
- Unoki, M., Masuda, A., Dohmae, N., Arita, K., Yoshimatsu, M., Iwai, Y., Fukui, Y., Ueda, K., Hamamoto, R., Shirakawa, M., et al. (2013). Lysyl 5-hydroxylation, a novel histone modification, by Jumonji domain containing 6 (JMJD6). *J. Biol. Chem.* *288*, 6053–6062.
- Vaahtomeri, K., and Mäkelä, T.P. (2011). Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS Lett.* *585*, 944–951.
- Vadlamudi, R.K., Manavathi, B., Balasenthil, S., Nair, S.S., Yang, Z., Sahin, A.A., and Kumar, R. (2005). Functional implications of altered subcellular localization of PELP1 in breast cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 7724–7732.
- Vallenius, T., Vaahtomeri, K., Kovac, B., Osiceanu, A.-M., Viljanen, M., and Mäkelä, T.P. (2011). An association between NUAK2 and MRIP reveals a novel mechanism for regulation of actin stress fibers. *J. Cell. Sci.* *124*, 384–393.
- Varricchio, L., Migliaccio, A., Castoria, G., Yamaguchi, H., Falco, A. de, Domenico, M.D., Giovannelli, P., Farrar, W., Appella, E., and Auricchio, F. (2007). Inhibition of Estradiol Receptor/Src Association and Cell Growth by an Estradiol Receptor α Tyrosine-Phosphorylated Peptide. *Mol Cancer Res* *5*, 1213–1221.
- Van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A.M., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., et al. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* *415*, 530–536.

Vilquin, P., Villedieu, M., Grisard, E., Larbi, S.B., Ghayad, S.E., Heudel, P.-E., Bachelot, T., Corbo, L., Treilleux, I., Vendrell, J.A., et al. (2013). Molecular characterization of anastrozole resistance in breast cancer: pivotal role of the Akt/mTOR pathway in the emergence of de novo or acquired resistance and importance of combining the allosteric Akt inhibitor MK-2206 with an aromatase inhibitor. *Int. J. Cancer*.

Vo, N., Fjeld, C., and Goodman, R.H. (2001). Acetylation of nuclear hormone receptor-interacting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6181–6188.

Wakeling, A.E., and Bowler, J. (1987). Steroidal pure antioestrogens. *J. Endocrinol.* *112*, R7–10.

Wakeling, A.E., Dukes, M., and Bowler, J. (1991). A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res.* *51*, 3867–3873.

Walker, P., Germond, J.E., Brown-Luedi, M., Givel, F., and Wahli, W. (1984). Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes. *Nucleic Acids Res.* *12*, 8611–8626.

Wander, S.A., Hennessy, B.T., and Slingerland, J.M. (2011). Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J. Clin. Invest.* *121*, 1231–1241.

Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., et al. (2001a). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J. Biol. Chem.* *276*, 18375–18383.

Wang, H., Huang, Z.Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B.D., Briggs, S.D., Allis, C.D., Wong, J., Tempst, P., et al. (2001b). Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* *293*, 853–857.

Wang, C., Dehghani, B., Magrisso, I.J., Rick, E.A., Bonhomme, E., Cody, D.B., Elenich, L.A., Subramanian, S., Murphy, S.J., Kelly, M.J., et al. (2008a). GPR30 contributes to estrogen-induced thymic atrophy. *Mol. Endocrinol.* *22*, 636–648.

Wang, C., Prossnitz, E.R., and Roy, S.K. (2008b). G protein-coupled receptor 30 expression is required for estrogen stimulation of primordial follicle formation in the hamster ovary. *Endocrinology* *149*, 4452–4461.

Wang, L., Pal, S., and Sif, S. (2008c). Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol. Cell Biol.* *28*, 6262–6277.

Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.-H., Perlin, J.R., Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., et al. (2004). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science* *306*, 279–283.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *336*, 1023–1027.

- Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor- α , hER- α 36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 9063–9068.
- Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2006). Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids* *71*, 91–95.
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., et al. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol. Endocrinol.* *13*, 1672–1685.
- Webby, C.J., Wolf, A., Gromak, N., Dreger, M., Kramer, H., Kessler, B., Nielsen, M.L., Schmitz, C., Butler, D.S., Yates, J.R., 3rd, et al. (2009). Jmjd6 catalyses lysyl-hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing. *Science* *325*, 90–93.
- Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J. Biol. Chem.* *275*, 40782–40787.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A., and Hogle, J.M. (2000). The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1165–1171.
- Weitsman, G.E., Li, L., Skliris, G.P., Davie, J.R., Ung, K., Niu, Y., Curtis-Snell, L., Tomes, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2006). Estrogen receptor- α phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. *Cancer Res.* *66*, 10162–10170.
- Welsh, A.W., Lannin, D.R., Young, G.S., Sherman, M.E., Figueroa, J.D., Henry, N.L., Ryden, L., Kim, C., Love, R.R., Schiff, R., et al. (2012). Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *18*, 118–126.
- Wolf, A., Mantri, M., Heim, A., Müller, U., Fichter, E., Mackeen, M.M., Schermelleh, L., Dadie, G., Leonhardt, H., Vénien-Bryan, C., et al. (2013). The poly-serine domain of the lysyl-5 hydroxylase Jmjd6 mediates subnuclear localization. *Biochem. J.*
- Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., et al. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* *25*, 118–145.
- Wolpert, N., Warner, E., Seminsky, M.F., Futreal, A., and Narod, S.A. (2000). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in male breast cancer patients in Canada. *Clin. Breast Cancer* *1*, 57–63; discussion 64–65.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G.D., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* *13*, 2004–2008.

- Woolley, C.S., Weiland, N.G., McEwen, B.S., and Schwartzkroin, P.A. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J. Neurosci.* *17*, 1848–1859.
- Wu, R.-C., Feng, Q., Lonard, D.M., and O'Malley, B.W. (2007). SRC-3 coactivator functional lifetime is regulated by a phospho-dependent ubiquitin time clock. *Cell* *129*, 1125–1140.
- Xie, Z., Dong, Y., Zhang, J., Scholz, R., Neumann, D., and Zou, M.-H. (2009). Identification of the serine 307 of LKB1 as a novel phosphorylation site essential for its nucleocytoplasmic transport and endothelial cell angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3582–3596.
- Xu, Z., Jiang, J., Xu, C., Wang, Y., Sun, L., Guo, X., and Liu, H. (2013). MicroRNA-181 regulates CARM1 and histone arginine methylation to promote differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* *8*, e53146.
- Yadav, N., Lee, J., Kim, J., Shen, J., Hu, M.C.-T., Aldaz, C.M., and Bedford, M.T. (2003). Specific protein methylation defects and gene expression perturbations in coactivator-associated arginine methyltransferase 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 6464–6468.
- Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C.L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res.* *62*, 4132–4141.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., and Fukamizu, A. (2008). Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol. Cell* *32*, 221–231.
- Yamashita, H., Nishio, M., Kobayashi, S., Ando, Y., Sugiura, H., Zhang, Z., Hamaguchi, M., Mita, K., Fujii, Y., and Iwase, H. (2005). Phosphorylation of estrogen receptor alpha serine 167 is predictive of response to endocrine therapy and increases postrelapse survival in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* *7*, R753–764.
- Yamnik, R.L., Digilova, A., Davis, D.C., Brodt, Z.N., Murphy, C.J., and Holz, M.K. (2009). S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* *284*, 6361–6369.
- Yang, X., Phillips, D.L., Ferguson, A.T., Nelson, W.G., Herman, J.G., and Davidson, N.E. (2001). Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res.* *61*, 7025–7029.
- Yi, P., Wu, R.-C., Sandquist, J., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., Means, A.R., and O'Malley, B.W. (2005). Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9687–9699.
- Yi, P., Feng, Q., Amazit, L., Lonard, D.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B.W. (2008). Atypical protein kinase C regulates dual pathways for degradation of the oncogenic coactivator SRC-3/AIB1. *Mol. Cell* *29*, 465–476.

- Ylikorkala, A., Rossi, D.J., Korsisaari, N., Luukko, K., Alitalo, K., Henkemeyer, M., and Mäkelä, T.P. (2001). Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* *293*, 1323–1326.
- Yoshimatsu, M., Toyokawa, G., Hayami, S., Unoki, M., Tsunoda, T., Field, H.I., Kelly, J.D., Neal, D.E., Maehara, Y., Ponder, B.A.J., et al. (2011). Dysregulation of PRMT1 and PRMT6, Type I arginine methyltransferases, is involved in various types of human cancers. *Int. J. Cancer* *128*, 562–573.
- Yu, H. (1998). Alcohol consumption and breast cancer risk. *JAMA* *280*, 1138–1139.
- Yu, Z., Vogel, G., Coulombe, Y., Dubeau, D., Spehalski, E., Hébert, J., Ferguson, D.O., Masson, J.Y., and Richard, S. (2012). The MRE11 GAR motif regulates DNA double-strand break processing and ATR activation. *Cell Res.* *22*, 305–320.
- Zagórska, A., Deak, M., Campbell, D.G., Banerjee, S., Hirano, M., Aizawa, S., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2010). New roles for the LKB1-NUAK pathway in controlling myosin phosphatase complexes and cell adhesion. *Sci Signal* *3*, ra25.
- Zakharova, L., Dadsetan, S., and Fomina, A.F. (2009). Endogenous Jmjd6 gene product is expressed at the cell surface and regulates phagocytosis in immature monocyte-like activated THP-1 cells. *J. Cell. Physiol.* *221*, 84–91.
- Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., and Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cell. Signal.* *24*, 2369–2377.
- Zhang, X., and Cheng, X. (2003). Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* *11*, 509–520.
- Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* *15*, 2343–2360.
- Zhang, J., Ni, S.-S., Zhao, W.-L., Dong, X.-C., and Wang, J.-L. (2013). High expression of JMJD6 predicts unfavorable survival in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol.*
- Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2011a). A positive feedback loop of ER- α /EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* *30*, 770–780.
- Zhang, Y., Moerkens, M., Ramaiahgari, S., de Bont, H., Price, L., Meerman, J., and van de Water, B. (2011b). Elevated insulin-like growth factor 1 receptor signaling induces antiestrogen resistance through the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling routes. *Breast Cancer Res.* *13*, R52.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor α : an overview and update. *Nucl Recept Signal* *6*.
- Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.-Y., Granter, S.R., Chin, L., and Cantley, L.C. (2009). Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol. Cell* *33*, 237–247.

Zhong, D., Liu, X., Khuri, F.R., Sun, S.-Y., Vertino, P.M., and Zhou, W. (2008). LKB1 is necessary for Akt-mediated phosphorylation of proapoptotic proteins. *Cancer Res.* 68, 7270–7277.

Zhong, J., Cao, R.-X., Hong, T., Yang, J., Zu, X.-Y., Xiao, X.-H., Liu, J.-H., and Wen, G.-B. (2011). Identification and expression analysis of a novel transcript of the human PRMT2 gene resulted from alternative polyadenylation in breast cancer. *Gene* 487, 1–9.

Zhong, J., Cao, R.-X., Zu, X.-Y., Hong, T., Yang, J., Liu, L., Xiao, X.-H., Ding, W.-J., Zhao, Q., Liu, J.-H., et al. (2012). Identification and characterization of novel spliced variants of PRMT2 in breast carcinoma. *FEBS J.* 279, 316–335.

Zwart, W., Griekspoor, A., Berno, V., Lakeman, K., Jalink, K., Mancini, M., Neefjes, J., and Michalides, R. (2007). PKA-induced resistance to tamoxifen is associated with an altered orientation of ERalpha towards co-activator SRC-1. *EMBO J.* 26, 3534–3544.

(2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 360, 187–195.

RESUME

Le cancer du sein représente une cause de mortalité élevée chez la femme. Le cancer du sein est un cancer hormono-dépendant. De ce fait, il est extrêmement important de définir le rôle joué par les différents acteurs protéiques de la signalisation hormonale, notamment la signalisation œstrogénique. Parallèlement aux effets nucléaires de ER α où l'hormone lie le récepteur nucléaire et régule la transcription génique, il existe une voie dite non génomique. L'équipe a montré que les œstrogènes induisent la méthylation de ER α , qui est un prérequis au recrutement de la PI3K et de la tyrosine kinase Src, conduisant à l'activation de molécules de signalisation telles que les MAPK et Akt, induisant prolifération et survie cellulaire. Durant ma thèse, j'ai pu démontrer que le complexe mER α /Src/PI3K existe *in vivo* et constitue un nouveau biomarqueur indépendant de mauvais pronostic. La recherche de nouveaux partenaires du complexe mER α /Src/PI3K nous a permis d'identifier le suppresseur de tumeur LKB1 et l'arginine déméthylase JMJD6. De façon surprenante, l'étude de l'expression de LKB1 par immunohistochimie dans une cohorte de tumeurs mammaires a montré une dualité fonctionnelle selon sa localisation subcellulaire. De plus, nous avons démontré que JMJD6 s'associe à ER α méthylé lorsque le récepteur est complexé à Src et PI3K, et permet ainsi la déméthylation de ER α et la dissociation du complexe mER α /Src/PI3K. Ce travail a ainsi pu mettre en évidence que les différents acteurs de cette signalisation peuvent constituer des éléments clés au diagnostique mais également lors de la décision thérapeutique, puisque qu'il existe des drogues pouvant cibler cette voie de signalisation.

Estrogen receptor α (ER α), belonging to the superfamily of hormone nuclear receptors, regulates many physiological processes, notably the growth and survival of breast tumor cells, acting as a ligand-dependent transcription factor. Besides to the well described transcriptional effects, estrogen also mediate extranuclear events called non genomic signaling via its receptor. In fact, team shows that ER α is methylated and that this event is a prerequisite for the recrutement of Src and PI3K and the activation of Akt which orchestrate cell proliferation and survival. During my PhD, I demonstrated that the non genomic signaling complex mER α /Src/PI3K exists in vivo and is operative. In addition, the complex is found to be an independent prognostic factor for disease free survival. This is an emergent concept that estrogen non genomic pathway is operative in vivo and can constitute a new therapeutic targets. The search for new partners of the complex has allowed us to identify the tumor suppressor LKB1 and arginine demethylase JMJD6. Expression of LKB1 in immunohistochemistry revealed dual properties based on its subcellular localization. When LKB1 is complexed with mER α /Src/PI3K it may acquire oncogenic properties. In addition, JMJD6 interacts with methylated ER α when the receptor is associated with Src and PI3K, and allows the demethylation of ER α and the dissociation of the complex mER α /Src/PI3K. This work showed that estrogenic non genomic players can constitute new therapeutic targets in Breast tumors.

MOTS CLE

Récepteur aux œstrogènes, Voies non génomiques, Méthylation des arginines, PRMT1, Déméthylation, LKB1, JMJD6, Cancer du sein.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

CRCL – Signalisation œstrogénique et cancer du sein – 28, rue Laennec 69373 Lyon Cedex 08