



**HAL**  
open science

# Régulation de l'activité de récepteur alpha des oestrogènes ( $ER\alpha$ ) par l'hypoxie et le facteur MKL1 dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires

Charly Jehanno

► **To cite this version:**

Charly Jehanno. Régulation de l'activité de récepteur alpha des oestrogènes ( $ER\alpha$ ) par l'hypoxie et le facteur MKL1 dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B050 . tel-01936342

**HAL Id: tel-01936342**

**<https://theses.hal.science/tel-01936342>**

Submitted on 27 Nov 2018

**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.

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale : Biologie-Santé - BS**

présentée par

**Charly JEHANNO**

Préparée à l'unité de recherche INSERM U 1085 IRSET  
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail  
Equipe « Transcription, Environnement et Cancer »  
UFR SVE – Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Régulation de l'activité  
du récepteur alpha des  
œstrogènes (ER $\alpha$ ) par  
l'hypoxie et par le  
facteur MKL1 dans un  
modèle de cellules  
cancéreuses  
mammaires**

**Thèse dirigée par :**

**Denis MICHEL**

*Professeur à l'université de Rennes 1 (HDR) /  
Directeur de thèse*

**Gilles FLOURIOT**

*Chargé de recherche CNRS / Co-directeur de thèse*

**et soutenue à Rennes le 15 décembre 2017**

Devant le jury composé de :

**Jean-François ARNAL**

*Professeur d'Université / Praticien Hospitalier  
(HDR), I2MC, Toulouse / rapporteur*

**Muriel LE ROMANCER**

*Directeur de Recherche INSERM (HDR), CRCL,  
Lyon / rapporteur*

**Nathalie THERET**

*Directeur de Recherche INSERM (HDR), Rennes /  
Examinatrice et Présidente du Jury*

**Denis MICHEL**

*Professeur à l'université de Rennes 1 (HDR) /  
Directeur de thèse*



## Résumé

Les œstrogènes, et en particulier l'œstradiol E2, régulent un nombre considérable de fonctions physiologiques au sein de l'organisme et permettent notamment l'établissement et le maintien des fonctions reproductives chez tous les vertébrés. L'E2 agit localement dans de multiples organes cibles via l'intermédiaire de ses récepteurs : ER $\alpha$  et ER $\beta$ . Par son action proliférative contribuant au renouvellement de l'épithélium mammaire, l'E2 ainsi que son récepteur ER $\alpha$  ont été associés au développement pathologique de tumeurs mammaires. Celles-ci sont qualifiées d'hormono-dépendantes car elles répondent pour la majorité d'entre elles à l'utilisation de l'hormonothérapie visant à bloquer leur croissance. Malheureusement, on estime que 30 à 40% des tumeurs mammaires finissent par présenter une résistance aux traitements anti-œstrogéniques, par des mécanismes extrêmement complexes.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour objectifs de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le phénomène d'échappement des cellules tumorales mammaires au contrôle hormonal. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux facteurs capables de moduler l'activité d'ER $\alpha$  : l'hypoxie, qui désigne l'appauvrissement en oxygène du microenvironnement cellulaire, et la voie RhoA/MKL1 fréquemment mise en place au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.

L'hypoxie est une caractéristique majeure des tumeurs solides, et des études lui suggèrent un rôle dans l'apparition de résistance endocrine. Nous montrons que le stress hypoxique inhibe fortement l'expression d'ER $\alpha$ , principalement au niveau protéique, et qu'il abolit la prolifération et la survie cellulaire induites par l'E2. L'analyse transcriptomique démontre qu'un certain nombre de gènes cibles d'ER $\alpha$  sont également régulés par l'hypoxie, qui peut soit réprimer (CXCL12...) ou bien augmenter leur expression (AREG...). Par ailleurs, l'analyse du cistrome d'ER $\alpha$  démontre une perte massive du nombre d'ERBSs (Estrogen Receptor Binding Site) par l'hypoxie, mais également une apparition d'ERBSs hypoxie-spécifiques. Nos résultats suggèrent que le fort recouvrement de régulation entre ER $\alpha$  et l'hypoxie puisse moduler l'efficacité des thérapies antihormonales.

Enfin, l'équipe a démontré que l'activation de la voie RhoA/MKL1 provoque une forte inhibition de la fonction AF1 d'ER $\alpha$ . Afin de mieux appréhender les effets de cette voie de signalisation sur l'activité d'ER $\alpha$ , une lignée cellulaire MCF7 exprimant stablement un mutant constitutivement actif du facteur MKL1 a été générée. Nous montrons que son expression modifie profondément le contexte cellulaire en provoquant le basculement d'un phénotype luminal vers un phénotype basal-like. L'analyse transcriptomique de la réponse à l'E2 montre que le changement d'orientation cellulaire induit par MKL1 abolit toute régulation transcriptionnelle des gènes cibles d'ER $\alpha$ . Ce changement d'orientation cellulaire s'accompagne d'une reprogrammation massive du cistrome d'ER $\alpha$  avec une perte importante de ses sites de fixation à la chromatine, mais également de façon inattendue, un enrichissement en nouveaux ERBSs. Enfin, nous montrons une forte augmentation des interactions « non-génomiques » d'ER $\alpha$  avec des partenaires cytoplasmiques tels que PI3K, MSK1 et src. Ces données suggèrent que dans des cellules agressives de type mésenchymal exprimant ER $\alpha$ , l'activité du récepteur repose majoritairement sur son action « non-génomique ». De façon intéressante, l'utilisation de l'anti-œstrogène pur ICI 162 673 n'a aucun effet inhibiteur sur ces interactions, pour lesquelles un rôle fonctionnel reste à établir.



## Liste des abréviations

3 $\beta$ -HSD : 3 $\beta$  Hydroxysteroïde Déhydrogénase

4-OHT : 4 Hydroxy-Tamoxifène

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AF : (trans)Activation Fonction

AhR : Aryl-hydrocarbon Receptor

ALDH1 : Aldehyde Désydrogénase 1

ANGPTL4 : Angiopoïétine-like 4

ARN : Acide RiboNucléique

APy2 : Activating Protein 2y

AR : Récepteur aux Androgènes

AREG : Amphiréguline

AVC : Accident Vasculaire Cérébrale

CARM1 : Coactivator Associated Arginine

Methyltransferase 1

CBP : CREB Binding Protein

ChiA-PET : Chromatin Interaction Analysis by

Paired-End Tag Sequencing

CHIP-Seq : Chromatin Immuno-Precipitation

Sequencing

CSC : Cancer Stem Cells

DBD : DNA Binding Domain

DHEA : Déhydroépiandrostérone

E1 : Estrone

E2 : Estradiol

E3 : Estriol

E4 : Estetrol

EDC : Estrogen Dendrimer Conjugate

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

EPO : Erythropoïétin

ER $\alpha/\beta$  : Récepteur aux Œstrogènes  $\alpha/\beta$

ERBS : Estrogen Receptor Binding Site

ERE : Estrogen Response Element

FAK : Focal Adhesion Kinase

FGF: Fibroblast Growth Factor

FHL2 : Four and half LIM-domain protein 2

FIH-1 : Factor Inhibiting HIF

FOX : ForkHead Box

FSH : Follicule Stimulating Hormone

GLUT : Glucose Transporter

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

GR : Récepteur aux Glucocorticoïdes

HAT : Histone Acétylase

HDAC : Histone Déacétylase

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HMT : Histone Methyl-transférase

HNSCC : Head and Neck Squamous Cell

Carcinoma

HRE : HIF Responsive Element

HRT : Hormone Replacement Therapy

IAP : Inhibitor of Apoptosis

IGF1 : Insulin Growth Factor 1

KDM : Lysine Déméthylase

LBD : Ligand Binding Domain

LH : Luteinizing Hormone

MaSC : Mammary Stem Cells

MDR1 : MultiDrug Resistance 1

MISS : Membrane Initiated Steroid Signaling

MKL1 : MegaKaryoblastic Leukemia 1

MMP : Metallo-Protéase

MR : Récepteur aux Mineralocorticoïdes

MRTF : Myocardin Related Transcription  
Factor

NCoR : Nuclear Co-Receptor

NLS : Nuclear Localization Signal

ORR : Objective Response Rate  
PLA : Proximity Ligation Assay  
PDGF : Platelet Derived Growth Factor  
PDX : Patient Derived Xenografts  
PFS : Patient Free Survival  
PGF : Placental Growth Factor  
PHD : Prolyl Hydroxylase Domain  
PI3K : Phosphoinositide Kinase 3  
PR : Récepteur à la Progestérone  
PRMT1 : Protein Arginine Methyltransferase1  
qPCR : quantitative Polymerase Chain  
Reaction  
RFS : Relapse Free Survival  
RN : Récepteur Nucléaire  
SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator  
SDF1 : Stromal-cells Derived Factor 1  
SMA : Smooth Muscle Actin  
SRB : Scarf Bloom & Richardson  
SRF : Serum Response Factor  
SRC :Steroid Receptor Coactivator  
SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable  
TAD : Topologically Associated Domains  
TamR : Résistant au Tamoxifène  
TCF : Ternary Complex Factor  
TET : Ten Eleven Translocation  
TFF1 : TreFoil Factor 1  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
TIC : Tumor Initiating Cells  
TNBC : Triple Negative Breast cancer  
TNM :Tumor Nodes Metastasis  
TSS : Transcription Starting Site  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VHL : Von-Hippel-Lindau





## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : La superfamille des récepteurs nucléaires.....	12
Figure 2 : Illustration des différentes voies de synthèses des hormones stéroïdiennes de type progestagènes, androgènes et œstrogènes à partir du cholestérol.....	13
Figure 3 : Comparaison schématique d'ER $\alpha$ et d'ER $\beta$ .....	18
Figure 4: Description des deux principaux variants d'épissage d'ER $\alpha$ , de 46 et 36 kDa.....	18
Figure 5 : Représentation schématique de la région centrale (domaine C) d'ER $\alpha$ .....	21
Figure 6 : Repliement différentiel de l'hélice 12 du « Ligand Binding Domain » d'ER $\alpha$ en fonction du ligand.....	23
Figure 7: Représentation schématique des différents niveaux de compaction que peut adopter la chromatine de la double hélice au chromosome.....	25
Figure 8 Des facteurs pionniers au démarrage de l'ARN polymérase II - Représentation séquentielle des différentes étapes de l'initiation de la transcription par ER $\alpha$ .....	34
Figure 9 : Effets membranaires rapides ou « non-génomiques » initiés par ER $\alpha$ .....	36
Figure 10 : Structure schématique de l'Estrogen Dendrimer Conjugate (EDC).....	36
Figure 11 : Modèle d'accumulation de mutations génétiques successives menant à l'apparition d'un cancer du colon.....	41
Figure 12 : Diversité des mécanismes de résistance détournés par les cellules tumorales.....	41
Figure 13: Incidence (bleu) et Mortalité (rouge) du cancer du sein au niveau mondial.....	44
Figure 14 : Catalogue de mutations somatiques dans 560 cas de cancer du sein.....	45
Figure 15 : Anatomie du sein chez la femme (A) et structure schématique d'un acinus ou d'une alvéole mammaire (B).....	47
Figure 16 : L'épithélium mammaire.....	47
Figure 17: Représentation schématique de la cascade Invasion/Métastase dans le cancer.....	50
Figure 18 : Représentation schématique de l'œstradiol et des principales molécules utilisées en thérapie hormonale.....	53
Figure 19 : Modèle d'activation paracrine de la prolifération des cellules luminales par l'amphiréguline induite par l'E2.....	57
Figure 20: Schéma illustrant la voie des facteurs de croissance épidermiques.....	63
Figure 21: Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/AKT.....	65
Figure 22: Paysage épigénétique de Conrad Hal Waddington.....	70
Figure 23: Représentation schématique de l'hypoxie intra-tumorale.....	72
Figure 24: Schéma illustrant la stabilisation post-traductionnelle des facteurs HIF $\alpha$ en hypoxie.....	75
Figure 25 : Domaines structuraux des facteurs HIF-1/2/3 $\alpha$ et de leur partenaire HIF-1 $\beta$ /ARNT (Aryl-Hydrocarbon Nuclear Translocator).....	76
Figure 26 : Hypoxie et développement tumoral malin.....	79
Figure 27: Schéma représentant l'activation de la voie RhoA-MKL1.....	86
Figure 28: Interrelations entre l'hypoxie et la motilité cellulaire.....	88
Figure 29 : Structure schématique de la protéine MKL1 et du mutant constitutivement actif $\Delta$ 200N MKL1.....	89
Figure 30 : L'hypoxie provoque une hétérogénéité de la disparition du récepteur aux œstrogènes dans les cellules MCF7.....	191
Figure 31: Représentation schématique du spectre de la différenciation des cellules cancéreuses mammaires proposée par RA Weinberg.....	192

Figure 32: Diagramme de Venn montrant l'absence de recouvrement entre les ERBS détectés de novo en hypoxie et dans le clone MKL1  $\Delta$ N200. .... 193

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	10
I. Les œstrogènes et leurs récepteurs .....	10
1. Introduction générale.....	10
2. Biosynthèse des œstrogènes.....	11
3. Effets physiologiques des œstrogènes .....	14
i. Œstrogènes & reproduction.....	14
ii. Œstrogènes & glande mammaire.....	15
iii. Œstrogènes, ostéoporose & risques d'AVC.....	15
iv. Œstrogènes & métabolisme .....	16
4. Les différents récepteurs aux œstrogènes.....	16
II. Description structurale d'ER $\alpha$ .....	19
1. La région NH <sub>2</sub> -terminale, domaines A/B & fonction de transactivation .....	19
2. La région centrale, domaines C/D .....	20
3. La région C-terminale, domaines E/F et fonction de transactivation 2 .....	20
III. L'activation de la transcription : des facteurs pionniers au démarrage de l'ARN Pol II .....	22
1. Le concept de facteurs pionniers .....	24
2. Les éléments de réponse d'ER $\alpha$ .....	26
3. Cofacteurs et marques histones associées : influence sur l'organisation chromatinienne ..	27
4. Répression de la transcription par ER $\alpha$ .....	28
5. Le complexe Médiateur.....	29
6. Initiation de la transcription & facteurs généraux. ....	30
7. L'interaction d'ER $\alpha$ avec les complexes AP1/SP1/RUNX1 : fixation ERE indépendante .....	31
IV. Activités non-génomiques d'E2, relayées par ER $\alpha$ .....	35
1. Découverte des effets « Non-Génomiques » .....	35
2. Intégration des effets non génomiques de l'E2 au niveau de la régulation génique.....	37
3. Le récepteur GPR30.....	38
V. Introduction générale au Cancer.....	39
VI. Le Cancer du Sein .....	42
1. Généralités et données épidémiologiques.....	42
2. Facteurs de risque .....	42
3. Le cancer du sein : du carcinome <i>in situ</i> au stade métastatique .....	46
i. La glande mammaire .....	46

ii.	Diagnostic initial et développement de la pathologie .....	48
iii.	Cancer métastatique .....	48
4.	Les différents types de tumeurs mammaires & traitements associés .....	51
5.	Rôles majeures de l'E2 et d'ER $\alpha$ dans la prolifération des cellules tumorales mammaires .	55
6.	Rôle de l'E2 dans la survie cellulaire .....	58
7.	ER $\alpha$ : Rôle dans l'EMT & dans les processus de migration/invasion .....	58
VII.	Mécanismes d'échappement au contrôle hormonal et résistance endocrine .....	59
1.	Mutations d'ER $\alpha$ .....	60
2.	Variants d'ER $\alpha$ .....	61
3.	ER $\alpha$ et la voie des facteurs de croissance de l'épiderme .....	61
4.	Le rôle des IGF dans le processus de résistance.....	64
5.	L'importance clinique de la voie PI3K/AKT/mTOR .....	64
6.	La balance des cofacteurs d'ER $\alpha$ .....	66
7.	Influence du contexte cellulaire sur le cistrome d'ER $\alpha$ .....	67
8.	L'hypothèse du « switch » luminal vers basal-like comme facteur de résistance endocrine	67
9.	ER $\beta$ et son rôle vis-à-vis d'ER $\alpha$ dans le cancer du sein.....	68
10.	Intégration contextuelle des travaux de thèse .....	69
VIII.	Hypoxie et Cancer .....	71
1.	Introduction générale à l'hypoxie .....	71
2.	Oxygène et métabolisme dans le cancer.....	73
3.	Les facteurs HIF $\alpha$ , les senseurs de l'oxygène à l'échelle cellulaire.....	74
4.	Epigénétique & facteurs HIF $\alpha$ .....	77
5.	L'hypoxie et son rôle dans la progression maligne du cancer.....	77
6.	Angiogénèse et thérapies anti-angiogéniques .....	80
7.	Les interrelations entre l'hypoxie et les voies de signalisation cellulaire .....	80
8.	Méthodes expérimentales pour générer de l'hypoxie.....	82
IX.	L'hypoxie comme facteur de résistance endocrine dans les cancers ER $\alpha$ (+).....	82
1.	Inhibition transcriptionnelle du gène <i>ESR1</i> et dégradation d'ER $\alpha$ par l'hypoxie .....	82
2.	Effets de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ .....	83
3.	Hypoxie et résistance hormonale.....	84
X.	La voie RhoA/MKL1/Actine .....	84
1.	Introduction générale.....	84
1.	La voie RhoA/Actine/MKL1 & son implication dans la transformation tumorale.....	87
2.	Lien entre Hypoxie et MKL1 .....	87

3. MKL1 et son influence sur l'activité d'ER $\alpha$ .....	90
Contexte et Objectifs des travaux de thèse .....	92
RESULTATS.....	94
I. Article 1: Hypoxic modulation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) transcriptional activity and binding to chromatin.....	96
II. Article 2: Artificially induced transition from luminal to basal-like phenotype of breast cancer cells engages a shift from genomic to non-genomic activities of ER $\alpha$ activity .....	132
DISCUSSION GENERALE .....	184
I. Modulation de la réponse aux thérapies hormonales par l'hypoxie .....	184
II. Hypothèses sur l'origine du blocage de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ dans le clone MKL1 $\Delta$ N200 .....	185
III. Modulation de l'axe CXCL12/CXCR4 par l'hypoxie et le mutant MKL1 $\Delta$ N200 : implication dans le processus de migration.....	187
IV. Conséquences de l'hypoxie et de l'expression du mutant MKL1 $\Delta$ N200 sur la différenciation luminaire des cellules MCF7 .....	188
V. Le basculement d'ER $\alpha$ d'une activité génomique vers non génomique est-il une caractéristique des cellules agressives ? .....	194
ARTICLES ANNEXES.....	196
I. Article 3: A model of dynamic stability of H3K9me3 heterochromatin to explain the resistance to reprogramming of differentiated cells.....	198
II. Article 4: Envisioning metastasis as a transdifferentiation phenomenon clarifies discordant results on cancer. ....	220
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	240





# INTRODUCTION





# INTRODUCTION

## I. Les œstrogènes et leurs récepteurs

### 1. Introduction générale

Tout au long de leur histoire évolutive, les organismes eucaryotes se sont complexifiés, tant au niveau de leur patrimoine génétique que de leur phénotype, et ont dû élaborer des stratégies qui leur permettent de survivre et de s'adapter à leur environnement. Les systèmes endocriniens en sont un parfait exemple, car tant chez les animaux que chez les végétaux, ils régissent une myriade de processus qui assurent le fonctionnement optimal de l'organisme. La croissance, le métabolisme, les rythmes biologiques, l'adaptation à des stress divers et bien évidemment la fonction la plus élémentaire d'un organisme vivant, la reproduction, sont tous des processus régulés de manière très fine par les hormones. Elles agissent comme des messagers à longue distance entre les différents organes et coordonnent toutes les fonctions de l'organisme par le biais de boucles d'autorégulation, qui assurent l'homéostasie des constantes physiologiques. Ces hormones peuvent être de nature protéique (GnRH, LH...) ou non, telles que les hormones thyroïdiennes ainsi que les hormones stéroïdiennes. Afin d'exercer leur activité biologique, les hormones, que l'on peut métaphoriquement assimiler à des clés disséminées dans l'organisme, agissent via des récepteurs que l'on peut imaginer sous forme de serrures, exprimées dans des tissus et même des types cellulaires particuliers. Les hormones possèdent donc une spécificité d'action spatiale et temporelle grâce à une localisation tissulaire précise de leurs récepteurs. En outre, une hormone, comme l'œstradiol peut lier plusieurs récepteurs (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ), et un récepteur hormonal peut interagir avec différentes hormones, comme c'est par exemple le cas pour le récepteur aux androgènes capable de lier la testostérone et la dihydrotestostérone.

Le génome des vertébrés possède six gènes codants pour six différents récepteurs aux hormones stéroïdiennes : le récepteur aux glucocorticoïdes (GR : NR3C1), aux minéralocorticoïdes (MR : NR3C2), aux progestagènes (PR : NR3C3), aux androgènes (AR : NR3C4) et enfin aux œstrogènes avec deux isoformes (ER $\alpha$  : NR3A1 - ER $\beta$  : NR3A2). Ces récepteurs ont tous été identifiés grâce à l'utilisation d'hormones tritiées qui étaient spécifiquement retenues par leurs récepteurs respectifs, puis isolés, et enfin clonés, ce qui a permis de dégager des domaines structuraux conservés (Carson-Jurica et al. 1990). Parmi ces domaines, il y a bien sûr celui permettant la liaison à l'ADN, le DBD « DNA Binding Domain » ainsi que le domaine de liaison au ligand, le LBD « ligand Binding Domain », contribuant tous deux à la fonction d'homodimérisation du récepteur. Enfin, il y a la région N-

terminale, qui porte une fonction de transactivation 1 (AF1) impliquée dans l'activité transcriptionnelle du récepteur. Par ailleurs, pour chacun de ces six récepteurs, la fonction AF1 lorsqu'elle est isolée du contexte cellulaire, conserve sa capacité à activer constitutivement la transcription (Tjian and Maniatis 1994).

Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN) qui compte aujourd'hui 48 membres chez l'homme et qui se démarque par sa grande conservation au sein des vertébrés (**figure 1**) (Huang et al. 2010; Zhao et al. 2015). Des études phylogénétiques confirment l'existence d'un récepteur ancestral commun à tous les récepteurs nucléaires, et donc d'un récepteur commun aux hormones stéroïdiennes. Ce dernier daterait d'environ 500 millions d'années et aurait, par succession d'évènements de duplications et de mutations, donné les six récepteurs décrits (Escriva et al. 1997; Arnal et al. 2017). Par ailleurs, la structure de ce récepteur originel rappelle celui de l'actuel récepteur aux œstrogènes, ce qui permet probablement de mieux comprendre et d'appréhender le caractère pléiotropique des œstrogènes.

## 2. Biosynthèse des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes, à l'instar des progestagènes, des androgènes ainsi que des glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes et constituent un petit groupe de stéroïdes composé de quatre molécules naturellement produites par l'être humain : l'estrone (E1) l'œstradiol (E2), l'estriol (E3) et l'estetrol (E4). Comme toutes les hormones stéroïdiennes, elles dérivent d'une cascade catabolique du cholestérol (27 carbones) fabriqué par l'organisme ou bien apporté par l'alimentation. Comme cela est décrit dans la **figure 2**, le cholestérol subit un clivage de sa chaîne carbonée latérale afin de donner un composé à 21 carbones, la prégnénolone, molécule précurseur de deux autres stéroïdes bien connus, la progestérone et la déhydroépiandrostérone (DHEA). Après oxydation de la DHEA via la 3 $\beta$  hydroxystéroïde déhydrogénase (3 $\beta$ -HSD), l'androsténédione peut donner ensuite d'une part la testostérone après hydroxylation par la 17 $\beta$ -HSD, ou bien donner d'autre part le premier composé de la famille des œstrogènes, l'estrone. L'aromatase de la testostérone par l'aromatase, ainsi que l'hydroxylation de l'estrone induit la synthèse de 17 $\beta$ -œstradiol (E2), molécule exerçant la plus forte activité oestrogénique au sein du groupe des œstrogènes. L'ovaire, le placenta, le tissu adipeux ainsi que le foie et les glandes surrénales constituent les sources de production d'E2 dans le corps humain, selon les chaînes de production présentées dans la **figure 2**.

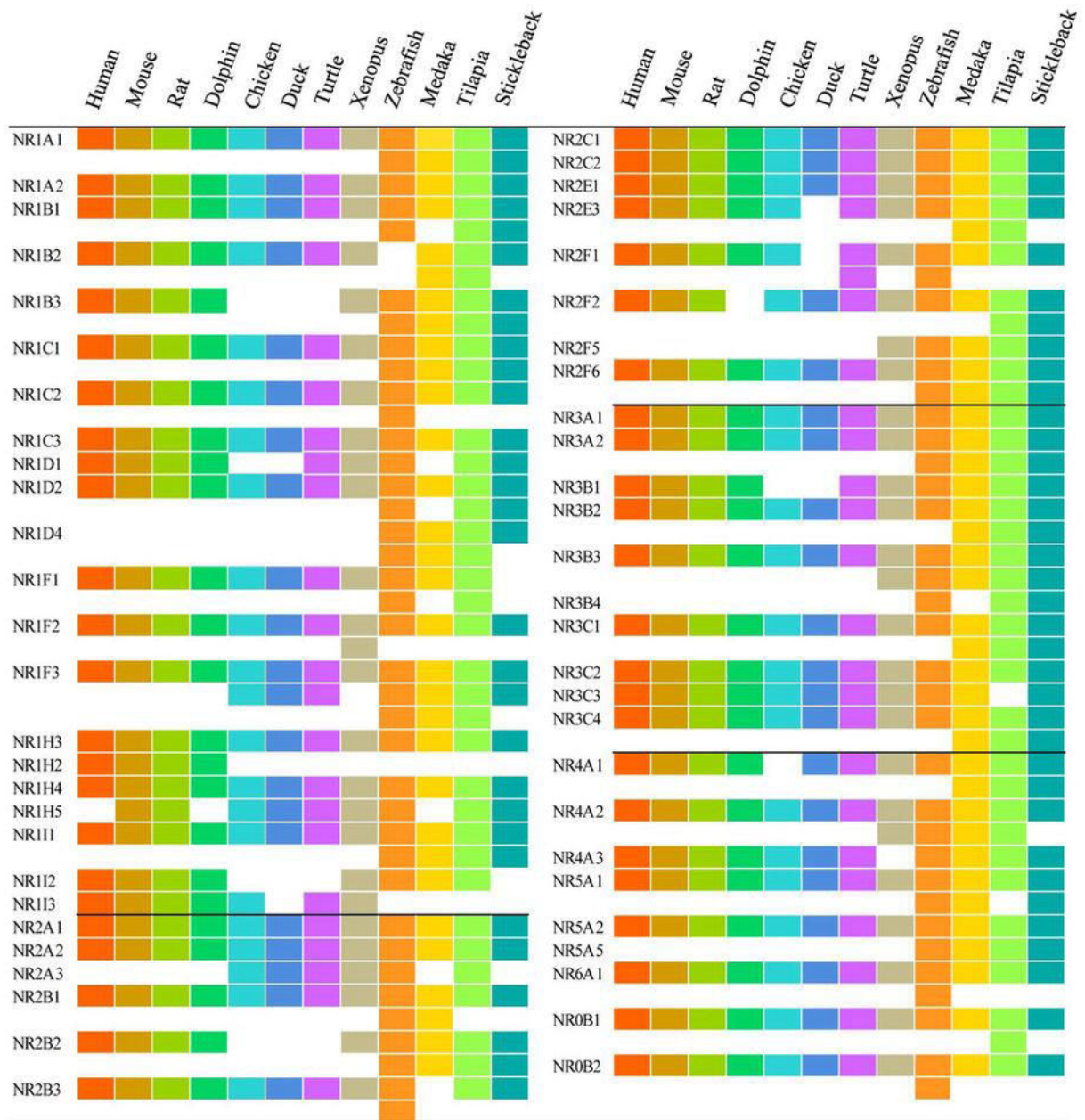


Figure 1 : La superfamille des récepteurs nucléaires.

Chaque récepteur nucléaire est représenté par un bloc de couleur. Les espaces blancs indiquent qu'aucun orthologue n'a été identifié. La famille des récepteurs nucléaires de chaque espèce de vertébrés est repérée par une couleur qui est de gauche à droite : homme ■, souris ■, rat ■, dauphin ■, poulet ■, canard ■, tortue ■, grenouille ■, poisson zèbre ■, médaka ■, tilapia ■ et épinouche ■ (NR3A1 = ER $\alpha$ ). D'après Zhao et al., 2015.

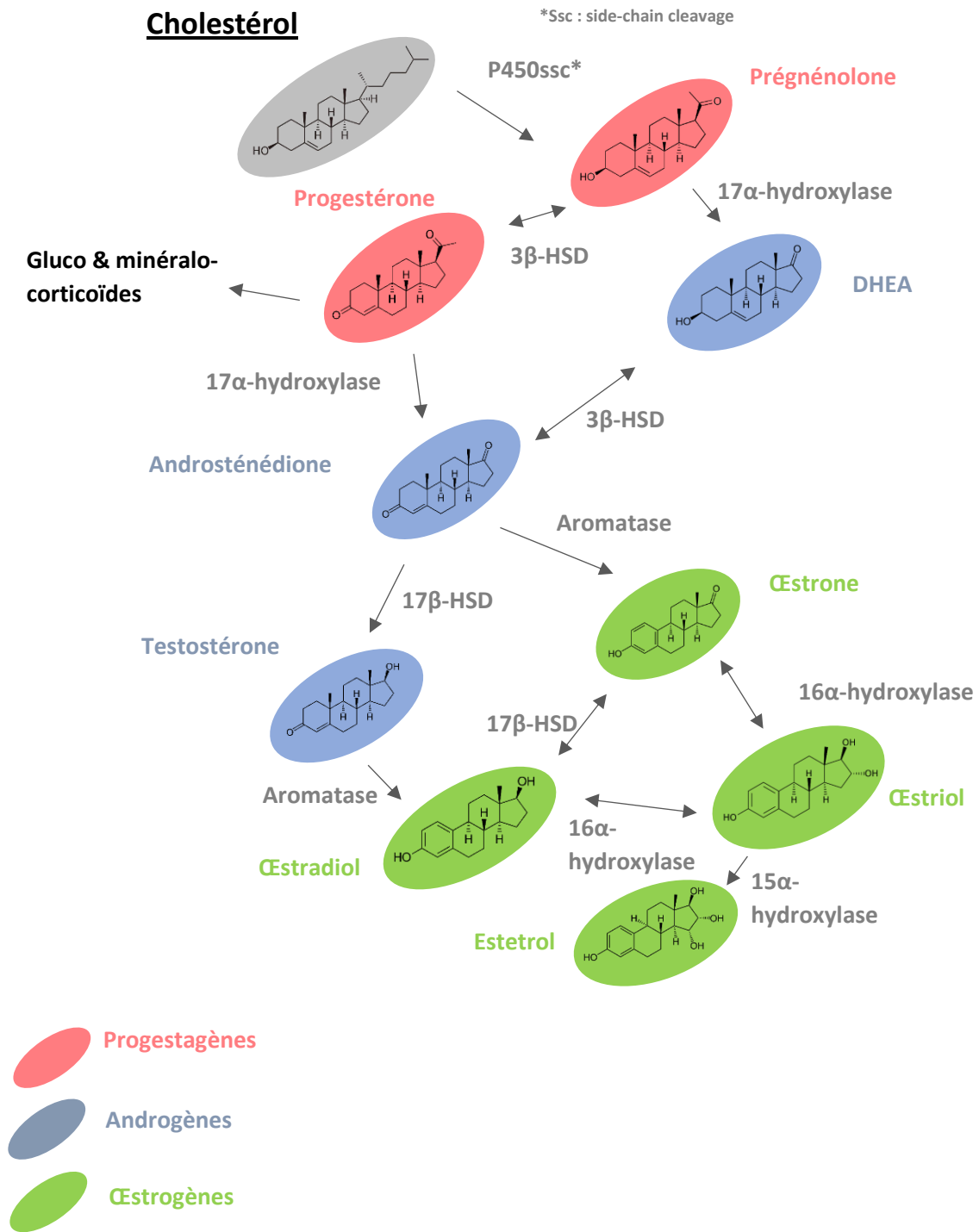


Figure 2 : Illustration des différentes voies de synthèses des hormones stéroïdiennes de type progestagènes, androgènes et œstrogènes à partir du cholestérol.

### 3. Effets physiologiques des œstrogènes

Les œstrogènes régulent un nombre considérable de fonctions cellulaires dans notre organisme. Ils sont donc naturellement associés à une grande diversité de situations pathologiques, telles que l'ostéoporose, la résistance à l'insuline, l'obésité, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives et enfin et surtout le cancer de l'utérus et du sein. Les divers effets des œstrogènes dans l'organisme sont décrits ci-dessous.

#### *i. Œstrogènes & reproduction*

Au cours de l'embryogénèse, la différenciation sexuelle s'oriente par défaut vers le sexe féminin, de façon indépendante de la présence des œstrogènes. Cependant, lors de la maturation sexuelle à la puberté, les œstrogènes ainsi que leurs récepteurs jouent un rôle prépondérant afin de garantir la fertilité. Par ailleurs, les inactivations d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$  chez la souris ne sont pas létales et seules les souris ER $\alpha$  -/- sont infertiles, ce qui prouve le caractère essentiel d'ER $\alpha$  pour la maturation sexuelle (Korach et al. 1996; Couse and Korach 1999).

Au sein de l'ovaire, l'œstradiol est synthétisé par les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa. Les cellules de la granulosa métabolisent les androgènes produits par les cellules de la thèque interne et les transforment en œstradiol par un processus d'aromatisation via l'enzyme Cyp19. L'œstradiol ainsi produit joue un rôle essentiel dans l'ovogénèse en contribuant à la maturation d'un follicule primordial vers un follicule mûr. Par ailleurs, l'E2 participe à la prolifération des cellules épithéliales de l'endomètre pendant le cycle menstruel et permet l'expression du récepteur à la progestérone, ce qui est indispensable à l'implantation de l'œuf lors de la nidation (Drummond and Findlay 1999). La sécrétion des œstrogènes est régulée par un système de rétrocontrôle négatif qui met en jeu l'axe hypothalamo-hypophysaire. La sécrétion de GnRH au niveau de l'hypothalamus stimule la libération de LH « Luteinizing Hormone » et de FSH « Follicle Stimulating Hormone » par l'hypophyse, ces hormones étant indispensables à l'enclenchement de la synthèse d'œstradiol dans les ovaires. L'E2 ainsi sécrétée exerce en retour un rétrocontrôle négatif sur la libération de GnRH, garantissant ainsi un système de régulation de l'homéostasie hormonale (Radovick et al. 2012; Treen et al. 2016). Chez des souris ER $\alpha$  -/-, cela se traduit par une forte augmentation sérique de la LH, de la FSH, de la prolactine ainsi que des œstrogènes, accompagnée d'une hypoplasie utérine et mammaire (Couse and Korach 1999; Gray et al. 2001).

## *ii. Œstrogènes & glande mammaire*

Le développement de la glande mammaire est un processus qui se déroule après la naissance, plus précisément durant la puberté, grâce à l'action conjointe d'hormones stéroïdiennes telles que la progestérone et les œstrogènes (LaMarca and Rosen 2007; Brisken and O'Malley 2010). L'inactivation d'ER $\alpha$  dans la glande mammaire empêche tout développement de l'épithélium ductal à partir du bourgeon mammaire (la structure de la glande mammaire est détaillée plus en avant, se référer à la figure X), ce qui signifie que les œstrogènes ne peuvent plus exercer leur action mitogène (Korach et al. 1996; Feng et al. 2007). Par ailleurs, l'équipe de Cathrin Brisken en Suisse a réalisé de façon très élégante des transplantations d'un mélange de cellules épithéliales mammaires sauvages ou bien ER $\alpha$  -/- chez des souris dépourvues de glande mammaire. Un développement chimérique d'un épithélium constitué des deux types cellulaires a été observé, permettant d'une part d'apprécier le rôle paracrine des cellules ER $\alpha$  (+) stimulées par l'E2 dans le développement de la glande mammaire et d'autre part de montrer que des cellules sauvages ER $\alpha$  (+) peuvent restaurer le phénotype des cellules ER $\alpha$  -/- (Mallepell et al. 2006). La description détaillée des effets des œstrogènes au niveau moléculaire dans la glande mammaire sera proposée dans la partie traitant des tumeurs mammaires ER $\alpha$  (+).

## *iii. Œstrogènes, ostéoporose & risques d'AVC*

Depuis très longtemps, une corrélation entre augmentation du risque d'ostéoporose et chute des taux d'œstrogènes circulants a été établie, ce qui laissait entrevoir un rôle majeur de ces hormones dans le tissu osseux (Albright et al. 1941). Ce tissu est composé de deux populations cellulaires principales ayant des rôles totalement opposés, permettant le renouvellement de ce tissu : les ostéoblastes qui sont les cellules qui forment l'os et les ostéoclastes qui le dégradent par résorption osseuse. Les œstrogènes, via leur récepteur, favorisent la survie et la différenciation des ostéoblastes, cellules exerçant une activité paracrine d'induction de l'apoptose au sein des ostéoclastes. Qui dit ménopause dit diminution du taux d'œstrogènes sérique, ce qui perturbe la balance ostéoblastes/ostéoclastes, provoquant la fragilisation osseuse chez les femmes âgées (Khosla 2010). La même observation a été faite pour les risques d'accidents vasculaires cérébraux, dont le risque s'accroît fortement chez la femme après la ménopause (Grodstein et al. 1996). Les E2 ont en effet un rôle protecteur vis à vis des AVC car ils peuvent induire de manière très rapide la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Les E2 stimulent l'activité de l'oxyde nitrique synthase de manière ER $\alpha$  dépendante, dans les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, ce qui permet la dilatation

des vaisseaux (Caulin-Glaser et al. 1997; Lantin-Hermoso et al. 1997). Par ailleurs, les E2 empêchent également des dépôts de cholestérol dans les artères, protégeant ainsi contre l'athérosclérose (Nathan and Chaudhuri 1997; Arnal et al. 2009).

#### iv. Œstrogènes & métabolisme

Chez l'homme comme chez la femme, le tissu adipeux est caractérisé par une forte activité de l'aromatase, ce qui permet d'assurer une production d'œstrogènes, notamment chez la femme ménopausée. De plus, après la ménopause, il a été constaté que les femmes pouvaient développer une prise de poids (Al-Safi and Polotsky 2015), traduisant un lien de cause à effet entre privation en œstrogènes et dérégulation du métabolisme. Cet effet d'augmentation de la masse adipeuse est également observée chez des souris ER $\alpha$  -/- (Couse and Korach 1999; Lee et al. 2009). En effet, les œstrogènes, très majoritairement via ER $\alpha$ , sont capables d'inhiber le catabolisme lipidique, très probablement en inhibant les récepteurs adrénergiques  $\alpha 2$  et  $\beta$ , indispensables à l'initiation de la lipolyse (Foryst-Ludwig and Kintscher 2010; Luglio 2014). A la ménopause, le taux d'E2 sérique ayant chuté, il s'opère une levée d'inhibition de la lipolyse ce qui favorise donc la prise de poids. Enfin un lien entre signalisation œstrogénique et homéostasie glucidique a également été décrit. L'E2 favorise l'absorption de glucose par les muscles et les adipocytes en augmentant la production d'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas (Alonso-Magdalena et al. 2008; Ropero et al. 2008).

#### 4. Les différents récepteurs aux œstrogènes.

La preuve de l'existence d'un récepteur capable de fixer l'œstradiol remonte aux années 1960, et notamment à un article publié par Elwood Jensen, dans lequel il remarque une rétention d'œstradiol tritié au niveau de l'épithélium utérin (Jensen 1962). Cette découverte lui vaudra d'ailleurs d'être en 2004, co-récepteur du prix Albert Lasker de la recherche médicale avec Ronald Evans et Pierre Chambon. C'est dans le laboratoire de Chambon que plus de 20 ans après, le premier récepteur aux œstrogènes, ER $\alpha$  (NR3A1) codé par le gène *ESR1*, fut cloné (Green et al. 1986). Par la suite, un deuxième récepteur aux œstrogènes, ER $\beta$  (**figure 3**), codé par le gène *ESR2* fut identifié (Mosselman et al. 1996). L'étude de ces récepteurs nucléaires atteint un degré supérieur de complexité lorsque divers transcrits alternatifs et isoformes protéiques de ces récepteurs sont caractérisés (**figure 4**). Une



présentation générale s'impose donc, celle-ci sera centrée sur l'isoforme ER $\alpha$ , récepteur sur lequel s'appuient ces travaux de thèse.

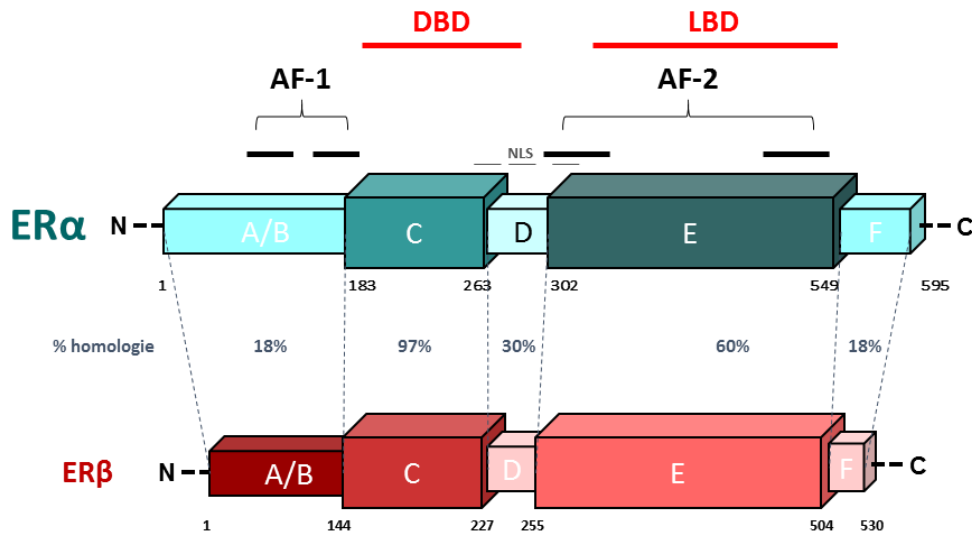


Figure 3 : Comparaison schématique d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$ .

Les différents domaines des deux récepteurs sont annotés par les lettres A à F, et la localisation des fonctions de transactivation, de liaison à l'ADN et de liaison avec le ligand sont précisées. Les pourcentages d'homologie des séquences pour chaque domaine sont indiqués, le domaine C étant celui pour lequel le pourcentage d'homologie est le plus fort. Cela se vérifie d'ailleurs au sein de la famille entière des RN. DBD : DNA Binding Domain, LBD : Ligand Binding Domain, AF : Activation Function.

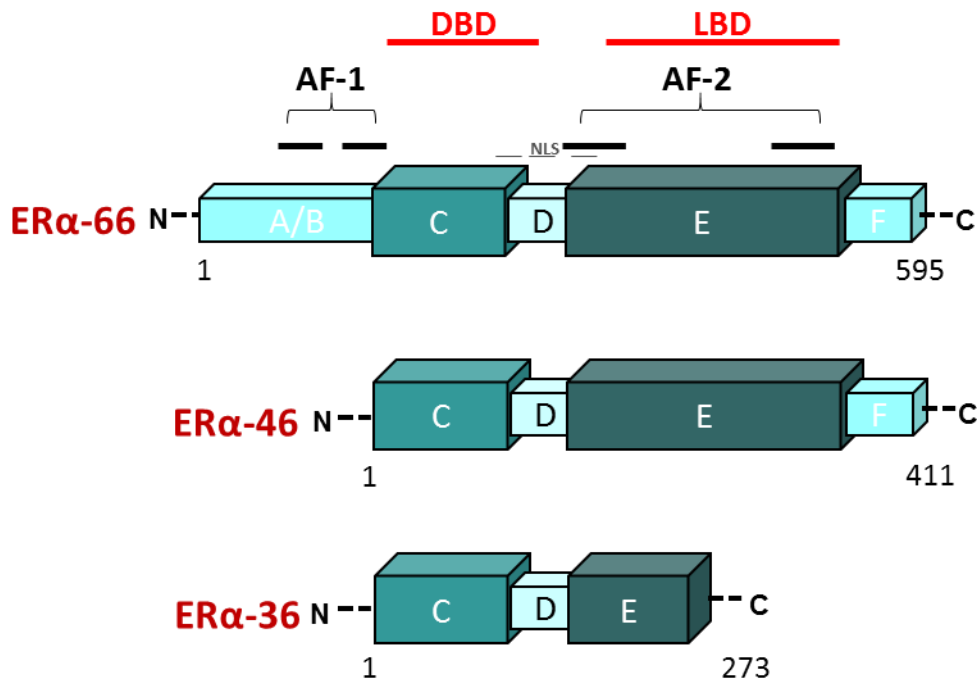


Figure 4: Description des deux principaux variants d'épissage d'ER $\alpha$ , de 46 et 36 kDa.

La forme de 46 kDa est dépourvue de l'intégralité de la fonction AF1, et ne possède donc que l'activité transcriptionnelle dépendante de la fonction AF2. La forme de 36 kDa est tronquée d'une partie du domaine E et de sa fonction AF2. Par conséquent elle ne possède pas d'activité génomique. L'isoforme de 36 kDa se localise principalement à la membrane plasmique et peut toujours initier les effets dits « non génomiques ».

## II. Description structurale d'ER $\alpha$

L'alignement des séquences protéiques des différents récepteurs nucléaires démontrent qu'ils partagent tous des modules structuraux semblables que l'on peut diviser en 3 régions, subdivisées en 6 domaines, de A à F .

### 1. La région NH<sub>2</sub>-terminale, domaines A/B & fonction de transactivation

Cette région est la plus variable au sein de la famille des récepteurs nucléaires, que ce soit en longueur ou bien en séquence, particulièrement pour le domaine A (Krust et al. 1986). Dans le cas d'ER $\alpha$ , ce domaine A correspond aux 38 premiers acides aminés de la protéine et aucune fonction particulière ne lui a été véritablement assignée. Il a simplement été montré qu'elle pouvait interagir avec le domaine C-terminal, afin d'empêcher une activation ligand indépendante du récepteur, par trans-répression.

Le domaine B a, quant à lui, été beaucoup mieux caractérisé puisqu'il porte la fonction de transactivation AF1 du récepteur. Cette fonction AF1 est parfois qualifiée de ligand-indépendante car elle possède une activité transcriptionnelle propre lorsqu'elle est isolée du reste du récepteur (Lees et al. 1989). Néanmoins cette appellation demeure abusive, car après liaison du récepteur à son ligand, cette fonction sert de plateforme de recrutement pour une multitude de cofacteurs transcriptionnels. Des mutants de délétion d'ER $\alpha$  ont permis d'identifier trois principaux sous domaines porteurs de la fonction de transactivation (Kumar et al. 1987; Metzger et al. 1995; McInerney et al. 1996). Ces boîtes sont les cibles de modifications post-traductionnelles et permettent de recruter les co-activateurs nécessaires à l'activité transcriptionnelle du récepteur, tels que les membres de la famille p160 ou bien le facteur CBP/p300 (Metivier et al. 2001). Parmi ces différentes modifications post-traductionnelles, on peut citer la phosphorylation des sérines 104, 106 & 118. Elles potentialisent les activités génomiques et non génomiques du récepteur en contribuant au recrutement d'une multitude de cofacteurs, et sont naturellement impliquées dans des phénomènes de résistance dans le cadre des cancers du sein hormono-dépendants (Ali et al. 1993; Le Goff et al. 1994; Bunone et al. 1996; Maggi 2011).

Si l'homme est le produit de son environnement, alors il en va de même pour les protéines, et ER $\alpha$  est l'exemple typique de facteur dont l'activité dépend du contexte cellulaire qui lui est associé. En effet, l'importance de la fonction AF1 est relative car dépendante du promoteur ainsi que du type

cellulaire (Bocquel et al. 1989; Metzger et al. 1992). Des travaux de l'équipe ont permis de montrer que l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  dans des cellules dédifférenciées telles que les Hela repose majoritairement sur la fonction AF2 alors qu'elle dépend principalement de la AF1 dans des cellules plus différenciées telles que les HepG2 (Huet et al. 2008). La présence notamment de jonctions cellulaires E-Cadhérine favorise par ailleurs l'activité AF1 du récepteur. La variabilité tissu-spécifique des contributions relatives de ces deux fonctions AF1 & AF2 permet de mieux comprendre pourquoi certaines molécules, comme le 4-OHT, peuvent avoir une activité agoniste ou antagoniste, selon le tissu considéré (Berry et al. 1990).

## 2. La région centrale, domaines C/D

Le domaine C porte deux fonctions élémentaires d'un récepteur nucléaire, à savoir la fonction de liaison à l'ADN et partiellement la fonction de dimérisation. Avec plus de 50% d'homologie entre les différents membres de la famille des RN, il est d'ailleurs le domaine le plus conservé, signe de son caractère essentiel. La cristallographie de ce domaine a permis d'identifier précisément deux modules globulaires à doigts de zinc, schématisés par la **figure 5** (Goldstein et al. 2001). Au sein de ces domaines se situent la P-Box ainsi que la D-box impliquées respectivement dans les processus de liaison à la chromatine et de dimérisation (Kumar and Chambon 1988). Par ailleurs, c'est au sein du domaine D que se localise le signal d'importation au noyau du récepteur NLS « Nuclear Localization Signal », indispensable à sa translocation (Ylikomi et al. 1992). La recherche de motifs constitués d'acides aminés basiques tels que les lysines, arginines et histidines a permis l'identification de trois motifs NLS entre les acides aminés 250 et 305. Cette région est également la cible de modifications post-traductionnelles influençant l'activité d'ER $\alpha$ , par exemple sur la méthylation de la lysine 302 par l'enzyme SET7 contribuant au recrutement de co-activateurs transcriptionnels (Sentis et al. 2005; Subramanian et al. 2008; Maggi 2011).

## 3. La région C-terminale, domaines E/F et fonction de transactivation 2

Le domaine C-terminal porte la fonction de transactivation AF2 ainsi que la région d'interaction avec le ligand que l'on désigne par « LDB » pour « ligand binding domain ». Des expériences de cristallographie ont permis d'identifier une structuration conservée de ce domaine au cours de l'évolution des récepteurs nucléaires, constituée d'hélices alpha et de feuillets beta formant une cavité hydrophobe dans laquelle vient se placer le ligand. Une fois encore, des mutants de délétion du

récepteur ont permis d'identifier une petite région entre les acides aminés 538 et 552, dite « AF2 core », située dans la fameuse hélice 12, portant la fonction de transactivation. Dans le cas d'ER $\alpha$ , le domaine E est composé de deux feuillets  $\beta$  et de 12 hélices  $\alpha$ , parmi lesquelles l'hélice 12 possède la conformation la plus labile.

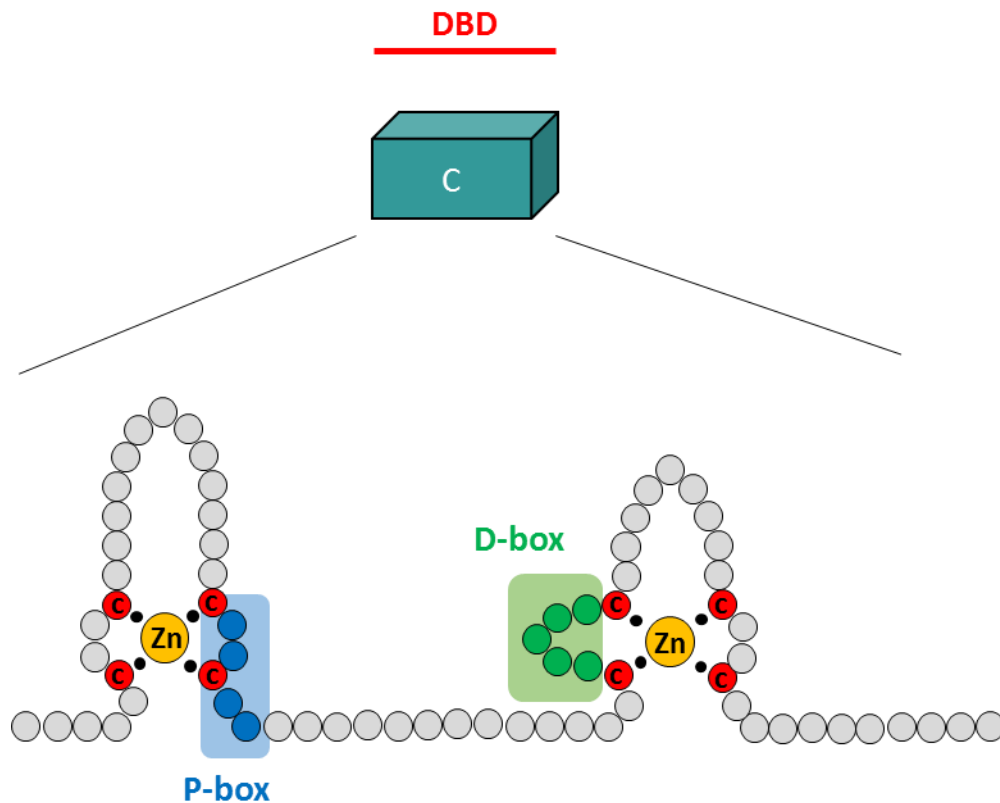


Figure 5 : Représentation schématique de la région centrale (domaine C) d'ER $\alpha$ .

Le domaine C d'ER $\alpha$  porte principalement la fonction d'interaction avec la chromatine, DBD « DNA Binding Domain ». Au sein de cette région formée de deux structures à doigt de zinc permettant l'interaction avec l'ADN, on retrouve la « P-box » qui est impliquée dans la reconnaissance des éléments de réponse d'ER $\alpha$  lorsque celui-ci est sous sa forme dimérique. La D-box, quant à elle, favorise la stabilisation du dimère.

En effet, en absence de ligand, la poche hydrophobe est dite ouverte, car l'hélice 12, à la manière d'un couvercle sort du domaine. En présence du ligand, l'hélice 12 se replie de sorte à fermer la poche, ce qui confère au récepteur une conformation 3D, permettant l'activation de la fonction AF2. Le repliement 3D de cette hélice 12 imposé par le ligand va déterminer l'activité agoniste ou bien antagoniste du récepteur, comme cela est expliqué en **figure 6**, avec l'exemple des repliements induits par le 4-OHT et l'ICI (Feng et al. 1998).

Le domaine E est également responsable pour une part non-négligeable de la capacité du récepteur à se dimériser. En effet, par un jeu complexe d'interactions entre des hélices  $\alpha$  des deux récepteurs formant le dimère, la liaison du ligand permet de stabiliser le complexe dimérique ce qui favorise l'activité génomique (Schwabe et al. 1990; Moras and Gronemeyer 1998; Padron et al. 2007).

Parmi les six domaines structuraux, le domaine F est le moins conservé au sein de la famille des RN, certains même n'en possédant pas. De plus, aucun rôle fonctionnel ne lui a été formellement attribué, considérant le fait que sa délétion n'entraîne aucune répercussion sur l'activité de transactivation du récepteur (Montano et al. 1995). Certains auteurs affirment néanmoins que du fait de sa longueur non négligeable, le domaine F pourrait constituer une surface d'interaction avec des cofacteurs et ainsi moduler la balance agoniste/antagoniste en fonction du ligand (Peters and Khan 1999).

La description segmentée de ces différents domaines structuraux du récepteur aux œstrogènes ne doit pas faire oublier leur caractère intrinsèquement synergique. En effet, selon le contexte cellulaire et selon la structure imposée par le ligand, le récepteur tout entier se conforme d'une manière qui déterminera aussi bien son activité génomique que non génomique.

### **III. L'activation de la transcription : des facteurs pionniers au démarrage de l'ARN Pol II**

Le schéma classique du contrôle de l'expression génétique par ER $\alpha$  peut se décrire simplement de la manière suivante : sous l'effet d'une stimulation hormonale, le récepteur se dissocie des protéines chaperons au profit d'une homodimérisation suivie de sa translocation nucléaire. Le dimère se lie ensuite à la chromatine au niveau de ses sites de fixation « ERBS, Estrogen Receptor Binding Site » et active la transcription des gènes cibles. On parle alors de régulation génomique directe. Néanmoins, d'autres modes d'action transcriptionnelle ont été décrits, notamment par interaction avec les facteurs SP1, AP1 (c-fos/c-jun), ou bien RUNX1. Cette régulation est dite génomique indirecte, car elle ne met pas en jeu un ERBS à proprement parler.

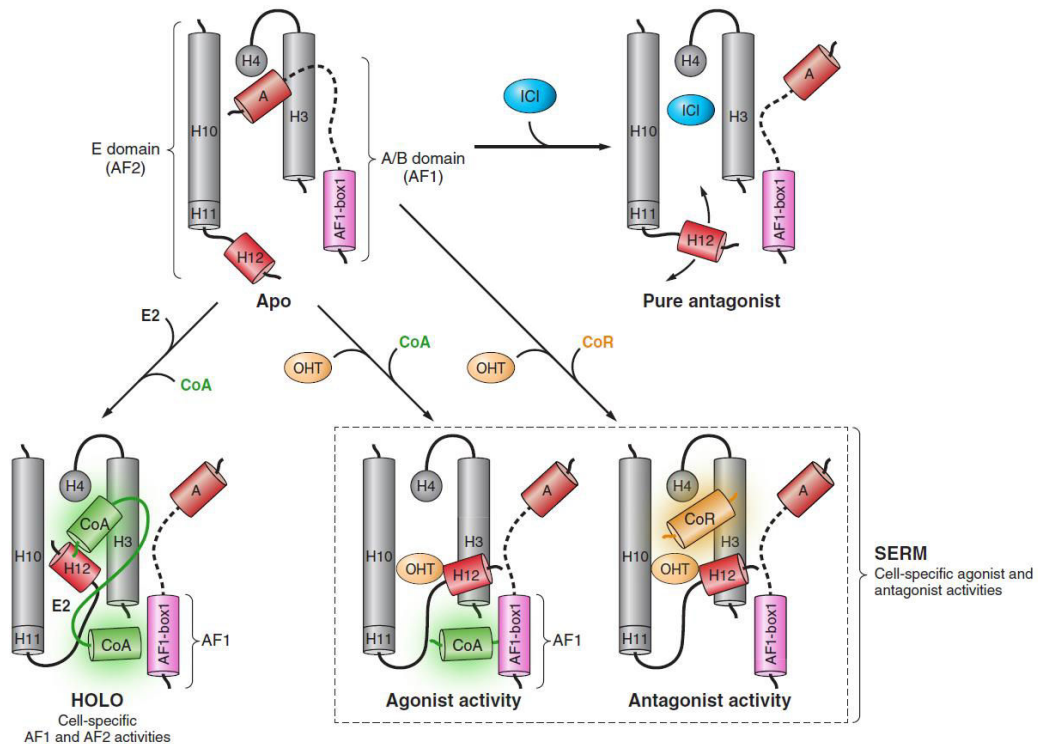


Figure 6 : Repliement différentiel de l'hélice 12 du « Ligand Binding Domain » d'ER $\alpha$  en fonction du ligand.

L'hélice 12 du LBD d'ER $\alpha$  possède la conformation la plus labile et la plus variable. Le ligand se fixe au récepteur dans une poche formée d'une douzaine d'hélices différentes, que l'hélice 12 vient refermer en présence d'E2, le ligand naturel. Ce repliement optimal permet le recrutement de cofacteurs qui vont assurer l'activité transcriptionnelle. En présence d'ICI, qui est un antagoniste pur, l'hélice 12 ne peut pas se replier inhibant toute activité transcriptionnelle. En présence de SERM tel que le 4-OHT, possédant une spécificité d'action tissulaire, la situation est plus complexe. Selon le type cellulaire dans lequel l'interaction ER $\alpha$ -4OHT se produit, le repliement de l'hélice 12 est tel qu'il favorise soit l'interaction avec des coactivateurs, soit avec des corépresseurs, en fonction de leur abondance. Le cylindre violet représente la partie N-terminale du récepteur (fonction AF1). HOLO forme ligandée et Apo forme non ligandée d'ER $\alpha$ . Ces schémas sont extraits de la revue (Arnal et al. 2017), et sont basés sur des données de cristallographie qui ont permis d'étudier le repliement 3D du domaine E ainsi que son interaction avec les différents ligands et cofacteurs.

## 1. Le concept de facteurs pionniers

Les avancées technologiques en matière de séquençage ont totalement reformaté notre approche de la biologie. La multiplicité des approches de types CHIP-seq « Chromatin Immunoprecipitation - Sequencing » a généré une masse considérable de données de cistromes pour une grande variété de facteurs de transcription. C'est grâce à ce type d'approches que l'on a pu comprendre que le profil de recrutement d'un récepteur sur la chromatine peut varier d'un type cellulaire à un autre et ainsi contrôler différemment, en coopération avec d'autres facteurs, l'expression de ses gènes cibles.

Le laboratoire de Myles Brown aux Etats-Unis a été pionnier, c'est le cas de le dire, dans l'étude approfondie de l'activité d'ER $\alpha$  au niveau chromatinien. C'est dans son laboratoire qu'a été réalisé le premier cistrome d'ER $\alpha$  (Carroll et al. 2006). L'étude approfondie de ces données de CHIP-seq a permis d'identifier à proximité d'ERBS, des motifs correspondant à d'autres facteurs de transcription. Certains « overlappings » peuvent parfois être extrêmement importants : par exemple plus de 50% des ERBS présentent un site de fixation pour FOXA1 « ForkHead Box A1 » (Hurtado et al. 2011), plus de 80% pour FOXM1 « ForkHead Box M1 » (Madureira et al. 2006)... Il en va de même pour le facteur PBX1 (Magnani et al. 2011), et pour le facteur GATA3 « GATA Binding Protein » (Eeckhoute et al. 2007). Cette observation a permis de valider le concept des facteurs pionniers, émis au début des années 2000 (Cirillo et al. 2002), qui coordonneraient des programmes transcriptionnels bien définis dans un type cellulaire donné, en régulant en amont l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription. L'état de compaction de la chromatine (**figure 7**) est en effet le principal obstacle à l'initiation de la transcription. Une brillante étude a permis d'appréhender le rôle crucial joué par ces facteurs pionniers en démontrant que l'inactivation du facteur FOXA1 s'accompagne d'une absence de recrutement en aval d'ER $\alpha$ , bloquant ainsi toute régulation (Caizzi et al. 2014). De la même manière, le facteur GATA3, par son action synergique avec FOXA1 a également été décrit comme indispensable au recrutement subséquent d'ER $\alpha$ . Il en est de même pour les facteurs PBX1 ou AP2 $\gamma$  « Activating Protein 2 $\gamma$  » (Cirillo et al. 2002; Eeckhoute et al. 2007; Magnani et al. 2011; Tan et al. 2011). Dans le cadre d'ER $\alpha$ , la liaison de ces différents facteurs pionniers au niveau de la chromatine n'est absolument pas régulée par la présence du ligand E2 (Lupien and Brown 2009).



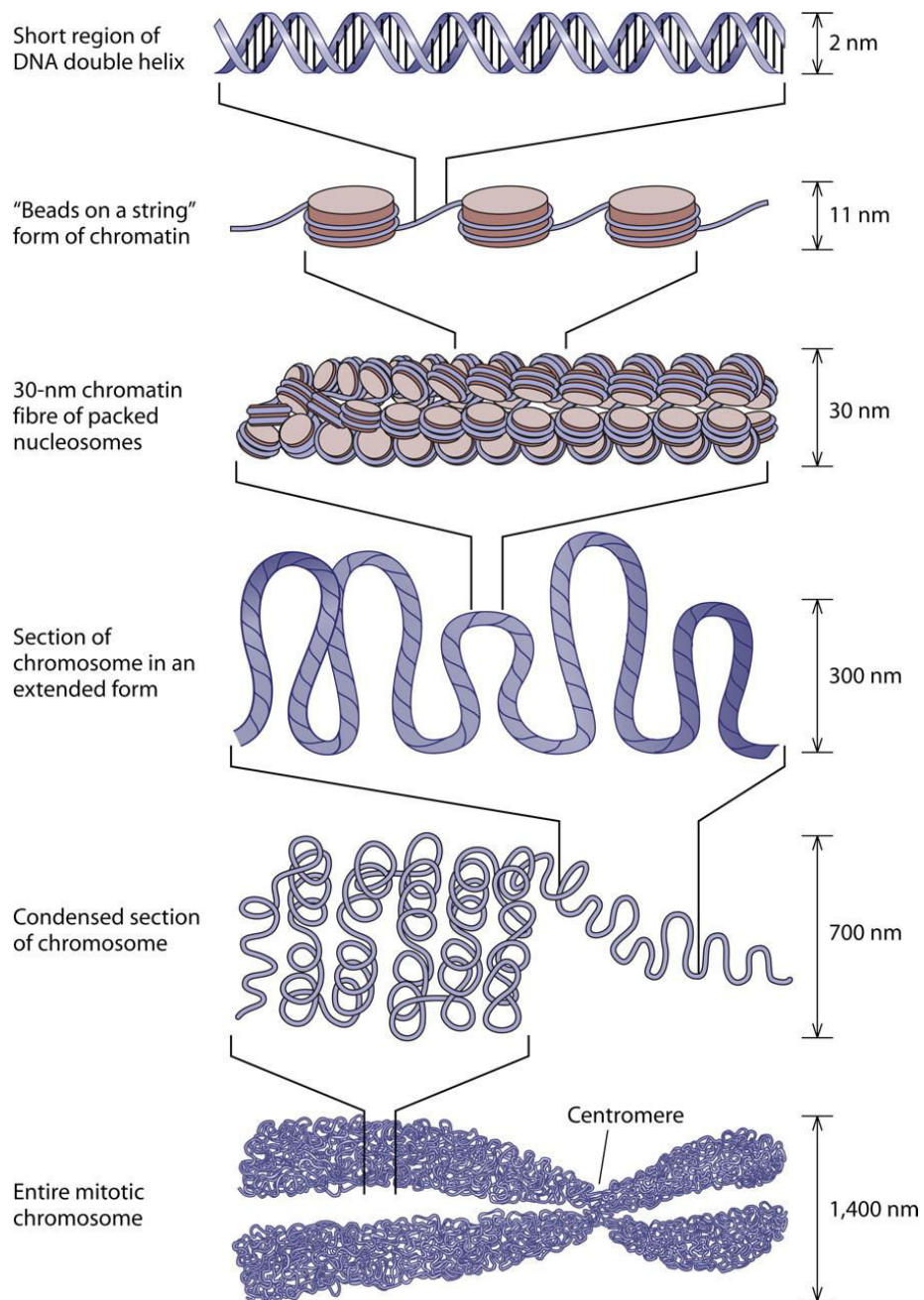


Figure 7: Représentation schématique des différents niveaux de compaction que peut adopter la chromatine de la double hélice au chromosome.

D'après <http://revistageneticamedica.com/blog/autor/amparo/>

La présence tissu-spécifique de ces différents facteurs pionniers participe à l'orientation de la destinée cellulaire ainsi qu'au maintien d'un état cellulaire différencié. L'inactivation du facteur GATA3 induit des défauts de morphogénèse de la glande mammaire ainsi qu'une absence de différenciation des cellules luminales (Asselin-Labat et al. 2007). Aussi, le KO *in vivo* de FOXA1 inhibe la différenciation luminale ainsi que la morphogénèse des canaux galactophores de la glande mammaire (Bernardo et al. 2010; Liu et al. 2016). L'abondance relative de ces différents facteurs coordonne des programmes transcriptionnels précis, et toute modification de leur expression peut conduire à des situations pathologiques, tels que des phénomènes de développements malins ou de résistance à l'hormonothérapie dans le cadre des cancers du sein exprimant ER $\alpha$  (Hurtado et al. 2011; Lee et al. 2014; Fu et al. 2016).

## 2. Les éléments de réponse d'ER $\alpha$

Une fois la chromatine rendue accessible, les récepteurs nucléaires tels qu'ER $\alpha$  possèdent des sites de fixation à l'ADN qui sont à la base de leur spécificité d'action. C'est grâce à leur région centrale composée des structures en doigts de zinc que s'opère l'interaction du récepteur avec la chromatine. Initialement, les éléments de réponses consensus ont été identifiés par l'étude du gène codant la vitellogénine chez le poulet et le xénope avec des expériences de « Chloramphenicol Acetyl Transferase Assay » (Walker et al. 1984). Cela a abouti à la détermination du motif palindromique consensus : RGGTCAnnnTGACCY (Green et al. 1986). Par ailleurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  partagent les mêmes sites de liaison à l'ADN (Yi et al. 2002). Les régions flanquantes, notamment par l'abondance d'adénine et de thymine à proximité du motif ERE, semblent contribuer à la stabilité du dimère sur la chromatine (Anolik et al. 1995).

Néanmoins l'analyse bio-informatique des cistromes d'ER $\alpha$  a permis de mettre en évidence de très fortes dégénérescences au niveau des séquences consensus ERE, en fonction du gène étudié. Il est très rare de trouver un ERBS parfaitement consensuel, et bien souvent il n'y a que des demi-sites, pouvant parfois être distants de plusieurs mégabases du gène régulé. Afin de rapprocher physiquement des éléments de réponse éloignés, la dynamique de la chromatine permet d'établir une architecture à base de boucles qui offre un niveau supplémentaire de complexité de régulation transcriptionnelle.

### 3. Cofacteurs et marques histones associées : influence sur l'organisation chromatinienne

ER $\alpha$  régule l'expression génique en recrutant des cofacteurs après s'être fixé à la chromatine. La conformation imposée à la fois par le ligand, par la structure en dimère et par la liaison à la chromatine permet le recrutement des cofacteurs via les fonctions de transactivation AF1 et/ou AF2, qui peuvent activer ou bien inhiber la transcription. Ces cofacteurs interagissent avec les récepteurs nucléaires grâce à la présence de motifs LXXLL (McInerney et al. 1998), et peuvent avoir des rôles structuraux ou bien disposer la plupart du temps d'une activité enzymatique propre de type histone acétyl-transférase (HAT), dé-acétylase (HDAC), méthyl-transférase (HMT)... Plus de 300 cofacteurs ont été caractérisés, et ER $\alpha$  à lui seul peut en recruter séquentiellement plus d'une centaine, ce qui offre des possibilités combinatoires gigantesques. Un très beau travail publié en 2003 dans la revue Cell par le laboratoire de Franck Gannon (EMBL) a permis de démontrer par des approches de CHIP que la dynamique de recrutement des co-activateurs par ER $\alpha$  ainsi que les marques épigénétiques associées, s'opéraient par cycles de façon extrêmement précise et ordonnée (Métivier et al. 2003).

Parmi les principaux co-activateurs d'ER $\alpha$  on retrouve les membres de la famille p160 (SRC1, SRC2 et SRC3 « Steroid Receptor Coactivator »), ainsi que p300/CBP « CREB Binding Protein ». Les facteurs SRC1 et SRC3 possèdent une activité HAT propre, mais leur rôle principal consiste à recruter p300/CBP qui possède une forte activité histone acétyl-transférase, permettant ainsi une transactivation efficace (Li et al. 2000). Ils permettent également le recrutement de protéines à activité méthyl-transférase telles que CARM1 « Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1 » et PRMT1 « Protein Arginine Methyltransferase 1 », ainsi que des protéines à activité ubiquitine-ligase telles que DZIP3 (Purcell et al. 2015), afin de moduler par modifications épigénétiques des histones, l'état de la chromatine. Parmi les protéines recrutées par le récepteur et ses partenaires p160, on retrouve ainsi des protéines capables de débobiner la structure chromatinienne, telles que des complexes ATP-dépendants de remodelage des nucléosomes comme SWI/SNF « Switch/Sucrose Non-Fermentable » (Belandia et al. 2002), ainsi que des complexes hélicases p68/p72 (Métivier et al. 2002).

Le recrutement des co-activateurs et plus largement l'activité génomique du récepteur sont très largement influencés par la présence de modifications post-traductionnelles au niveau de la fonction AF1 (Ali et al. 1993), aussi bien par acétylation (Kim et al. 2006), par sumoylation (Sentis et al. 2005) que par phosphorylation (Atsriku et al. 2009; Ward and Weigel 2009). Ces modifications sont bien souvent reliées à la voie des facteurs de croissance et seront détaillées ultérieurement.

Une donnée extraite des cistromes d'ER $\alpha$  et qui pourrait paraître anecdotique, indique qu'à peine 5% des ERBS sont localisés à proximité d'une région promotrice (Zwart et al. 2011). Cette observation simple laisse entrevoir une complexité infinie de dynamique de la chromatine, qui commence à être largement décortiquée grâce au développement de techniques de « chromatin conformation capture » et de ChiA-PET « Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing » (Dostie et al. 2006; Sati and Cavalli 2017). Ces techniques permettent d'appréhender le remodelage de la chromatine en 3D, et ont permis de mettre en évidence la présence de boucles permettant à certains ERBS distants de plusieurs dizaines de kilobases, de se retrouver impliqués dans la régulation transcriptionnelle d'un même gène (Mohamed et al. 2009). Ces boucles de chromatine, parfois longues de 1 à 2 Mb, précisément formées en réponse à une stimulation hormonale, ont permis de conceptualiser la notion de TAD pour « Topologically associated domains » au sein desquels un groupe de gènes peut être co-régulé (Le Dily et al. 2014). Le recrutement d'ER $\alpha$  s'effectue au niveau de régions régulatrices « enhancers » qui sont caractérisées par la présence de marques histones spécifiques, telles que H3K4me2 ainsi que H3K27Ac (Heintzman et al. 2007; Spicuglia and Vanhille 2012). Ces marques sont associées à la présence des facteurs pionniers qui préparent la chromatine pour la liaison d'ER $\alpha$  ainsi qu'au recrutement ER $\alpha$ -dépendant de « remodelers » à activité histones méthyl ou acétyl-transférase (Lupien and Brown 2009).

Bien souvent l'activité transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire est réduite à son activité sous sa forme ligandée. Cependant, une étude publiée en 2014 dans la revue PNAS a permis de montrer qu'en absence de ligand, ER $\alpha$  était capable de lier plus de 4 000 ERBS, à proximité de gènes impliqués majoritairement dans des processus de différenciation et de développement (Caizzi et al. 2014). Les auteurs montrent également que l'extinction par shRNA d'ER $\alpha$  inhibe le recrutement des facteurs pionniers comme FOXA1 et PBX1, ce qui remet en question le dogme hiérarchique de recrutement séquentiel des facteurs pionniers puis des récepteurs nucléaires au profit d'une vision plus dynamique et coopérative.

#### **4. Répression de la transcription par ER $\alpha$**

Lorsque l'on effectue une analyse transcriptomique de la réponse oestrogénique sur des cellules MCF7, l'attention est souvent portée principalement sur les gènes régulés positivement, alors que près de la moitié le sont négativement. En effet, ER $\alpha$  peut également recruter des co-répresseurs, tels que les complexes N-CoR « Nuclear Co-Receptor », capable de recruter des enzymes à activité histone déacétylase HDAC 3, 4, 5 & 7 (Osborne et al. 2001). Très peu d'études se sont intéressées de

manière globale à la fonction répressive du récepteur, la plupart d'entre elles se sont intéressées à des gènes de façon ciblée, tels que HER2, Cyclin G2 ou encore RPRM « RePRiMO » (Perissi et al. 2000; Stossi et al. 2006; Malik et al. 2010). Néanmoins, il existe une étude récente qui s'est intéressée expérimentalement aux mécanismes de répression de la transcription. Par des approches haut-débit de 5C/Chia-PET/GRO-Seq, les auteurs ont montré qu'il y avait une réorganisation spatiale de la chromatine sous l'effet de l'E2 au niveau des gènes réprimés, sans apparition de marques histones répressives telles que H3K27me3. Ils émettent l'hypothèse que le recrutement d'ER $\alpha$  sur ces séquences fragilise les pré-complexes formés, empêchant de fait le recrutement de co-activateurs et de l'ARN polymérase II (Osmanbeyoglu et al. 2013).

Enfin, la nature du ligand utilisé peut déterminer l'activité permissive ou répressive du récepteur (Cicatiello et al. 2004). Cela est parfaitement illustré par le mode d'action du tamoxifène qui inhibe l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  en imposant un repliement impropre de l'hélice 12 du LDB (**figure 6**). Par des approches de CHIP ciblées au niveau des éléments régulateurs du gène TFF1 « TreFoil Factor 1 », les auteurs montrent que le récepteur lié au 4-OHT recrute NcoR, TBL1, NuRD/HDAC1 & HDAC3 pour réprimer l'expression génique, via la fonction AF1 (Liu and Bagchi 2004).

## 5. Le complexe Médiateur

Selon la nature du ligand et l'ERBS considéré, le processus transcriptionnel peut se poursuivre, et nécessite l'attachement des complexes de facteurs de transcription à un complexe qui effectue le lien physique avec la machinerie réplivative : le complexe Médiateur (Blazek et al. 2005). Ce complexe est conservé de la levure à l'homme et se compose d'environ une trentaine de sous-unités, regroupées selon la terminologie « MED » dont l'assemblage donne la spécificité d'action du complexe. Certaines sous-unités appartiennent au cœur du complexe et sont ubiquitaires (Ex : MED7... etc), alors que d'autres sont tissu-spécifiques et leur absence ou leur présence peuvent orienter la destinée cellulaire (Allen and Taatjes 2015). Par exemple, dans un modèle de cellules souches embryonnaires, celles-ci peuvent se différencier en adipocytes si MED23 est présent, ou bien en cellules musculaires lisses si l'expression de MED23 est éteinte par KO (Yin et al. 2012).

Dans le cas des récepteurs nucléaires, l'interaction avec le complexe Médiateur s'effectue via la sous-unité MED1 (Wärnmarkt et al. 2001; Wang et al. 2002; Zhang et al. 2005). Sans cette interaction, l'activité transcriptionnelle du récepteur est drastiquement inhibée *in vitro*, comme le montrent des expériences de gènes rapporteurs ou de qPCR (Zhang et al. 2011a). *In vivo*, le KO de cette sous-unité MED1 mais également de la sous-unité MED24 interagissant avec MED1, entraînent un

important retard de développement de la glande mammaire, ainsi qu'une perte importante de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Hasegawa et al. 2012). Le KO de MED1 ainsi que sa surexpression ont également été associés à des phénomènes de résistance dans les cancers du sein hormono-dépendants (Nagalingam et al. 2012).

La présence ou l'absence de certaines des sous-unités du complexe Médiateur offre un niveau supplémentaire de régulation combinatoire, permettant d'affiner toujours plus la spécificité d'action tissulaire d'ER $\alpha$  et des récepteurs nucléaires en général. En aval de ces interactions, le complexe Médiateur établit un lien physique entre les mégas complexes de facteurs de transcription et les facteurs généraux de la transcription. Des études de biologie structurale indiquent que les interactions entre les sous-unités MED18 et MED20 et le facteur TFIIB permettent de stabiliser le complexe polymérase avant son activation par phosphorylation (Plaschka et al. 2016).

## **6. Initiation de la transcription & facteurs généraux.**

Longue et parsemée d'embûches est la route qui mène de l'activation transcriptionnelle jusqu'à la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Après avoir décrit les mécanismes responsables de l'activation du récepteur et de la préparation des enhancers, ainsi que l'importance du complexe Médiateur, nous arrivons maintenant aux mécanismes généraux d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II. Le complexe de pré-initiation, constitué des facteurs généraux de la transcription (TFIIA, B, D, E, F & H) ainsi que l'ARN polymérase II, interagit avec le promoteur minimal à proximité du TSS « Transcription Starting Site », ce qui constitue la dernière étape avant la production de l'ARNm (Butler and Kadonaga 2002). L'assemblage séquentiel et précis de chacun de ces acteurs, à commencer par la liaison de la TATA-Box par le facteur TFIID (constitué du facteur TBP et des facteurs TAF), jusqu'au démarrage de l'ARN pol 2 en réponse à la multiple phosphorylation de son domaine carboxy-terminal par le facteur TFIIH (motif répété de 7 aa : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) (Svejstrup et al. 1996), est un processus commun à l'ensemble des gènes dont l'ARNm correspondant code une protéine.

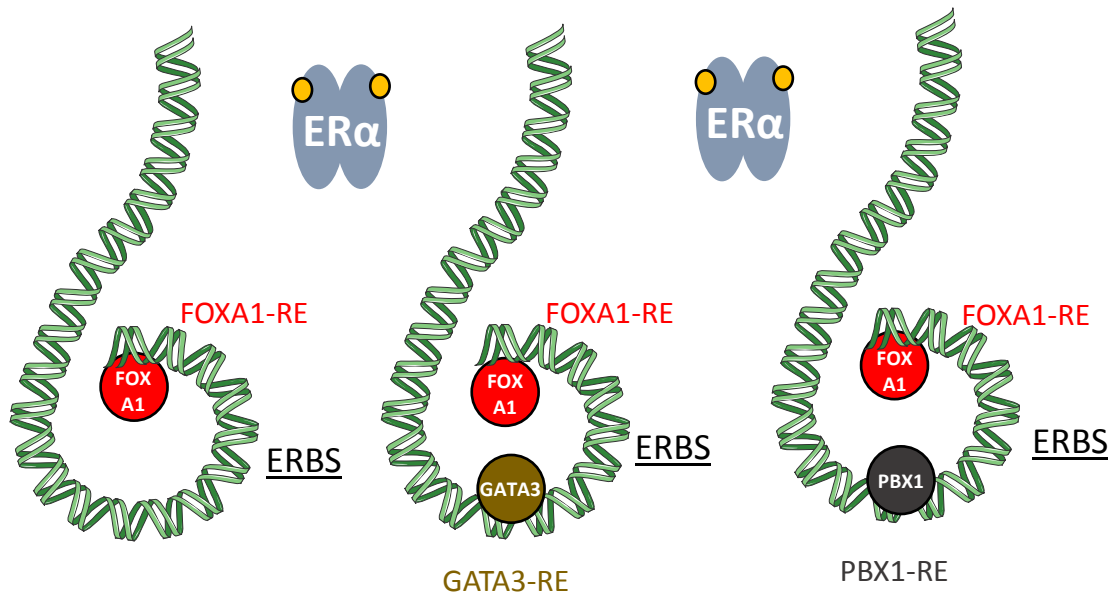
Par souci de concision, les processus de maturation de l'ARNm, d'épissage alternatif, et de traduction protéique ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, mais constituent les dernières étapes clés en aval de la transcription qui mènent jusqu'à la production d'une protéine fonctionnelle.

## 7. L'interaction d'ER $\alpha$ avec les complexes AP1/SP1/RUNX1 : fixation ERE indépendante

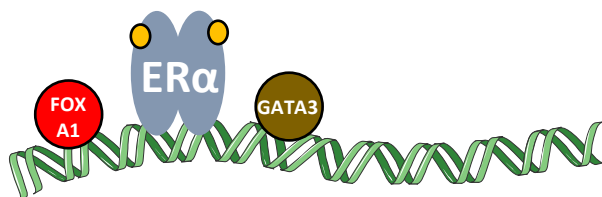
L'analyse bio-informatique des données de cistrome d'ER $\alpha$  a révélé une absence de séquence ERE canonique pour une fraction importante des sites liés par le récepteur. Cela témoigne d'un mécanisme d'attachement à la chromatine indirect en coopération avec d'autres facteurs de transcription, de façon bien tissu spécifique. Parmi ces différents partenaires on retrouve les complexes AP1 et SP1 mais également des facteurs tels que RUNX1, PITX1 ou encore NF $\kappa$ B (Umayahara et al. 1994; Safe 2001; Quaedackers et al. 2007; Stender et al. 2010, 2011).

Les différentes étapes permettant l'activation transcriptionnelle par ER $\alpha$  sont résumées par la **figure 8**.

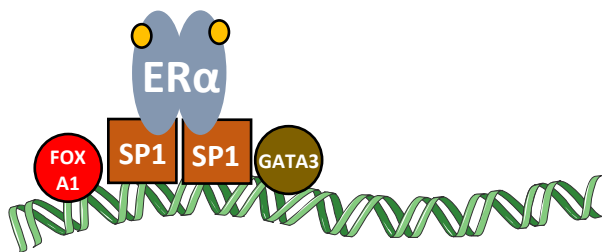
A : Préparation de la chromatine par les facteurs pionniers



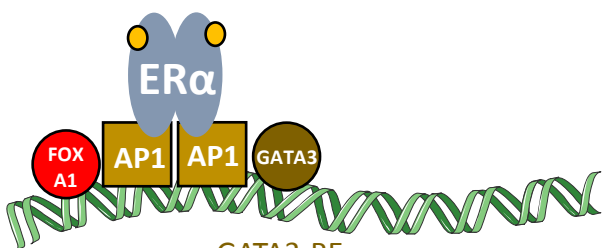
B : Recrutement direct d'ERα ou bien par l'intermédiaire d'autres facteurs



**Séquence ERE :**  
(A/G)GGTCAnnnTGACC(T/C)



**Élément de réponse SP1 :**  
(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)  
(G/C riche)



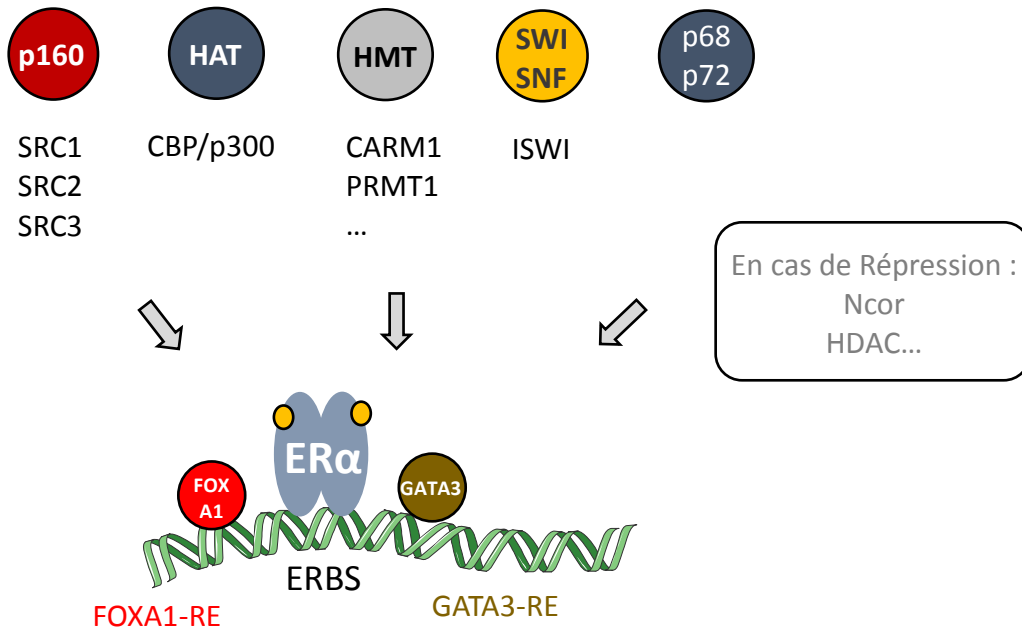
**Élément de réponse AP1 :**  
TGA(G/C)TCA

FOXA1-RE

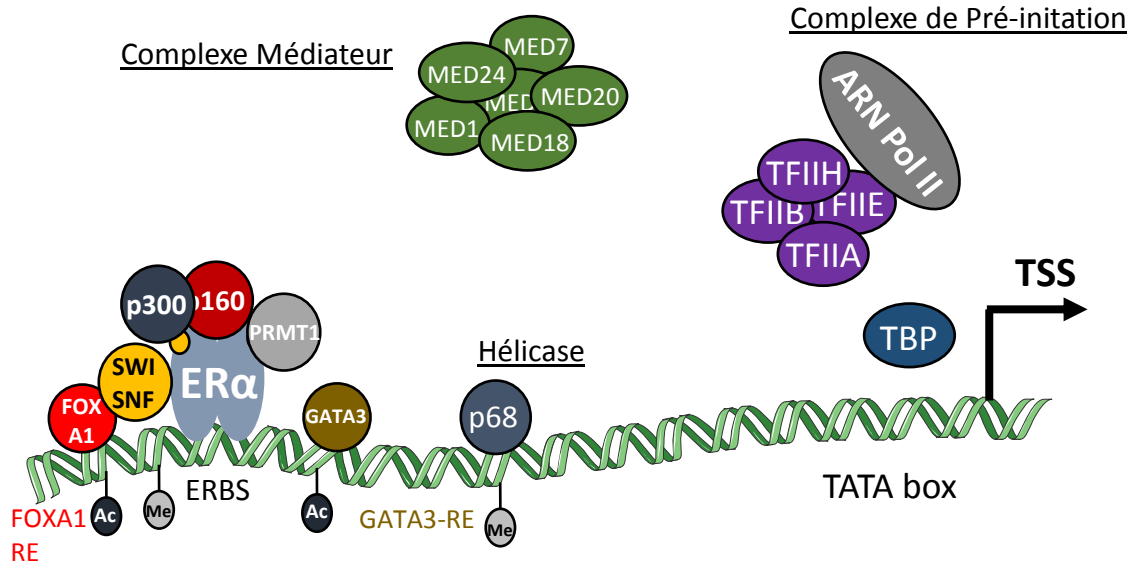
GATA3-RE



C : Recrutement de différents co-activateurs transcriptionnels



D : Remodelage épigénétique & arrivée des complexes médiateur et de pré-initiation



E : Couplage physique entre la machinerie de réplication et les facteurs de transcription par le complexe médiateur permettant le démarrage de la transcription

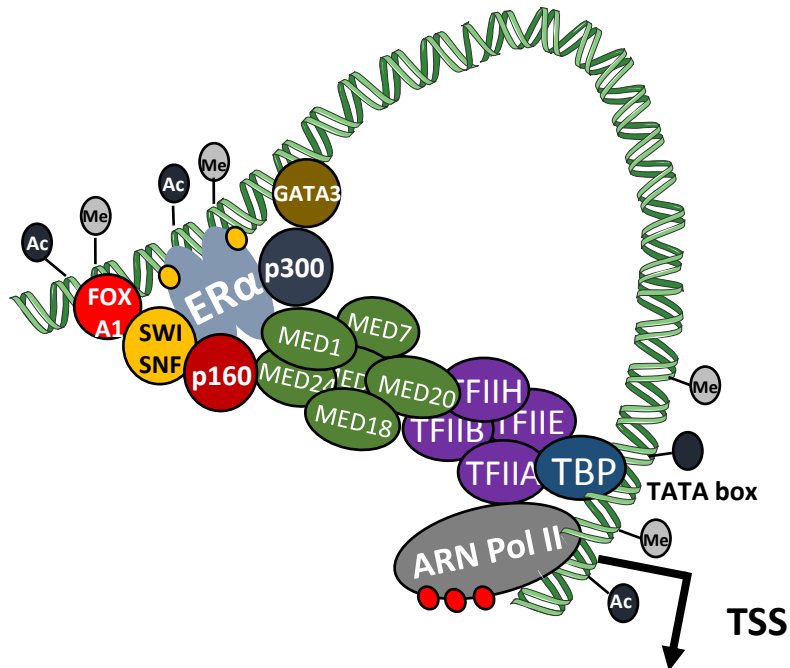


Figure 8 Des facteurs pionniers au démarrage de l'ARN polymérase II - Représentation séquentielle des différentes étapes de l'initiation de la transcription par ER $\alpha$ .

(A) Les facteurs pionniers, tels que FOXA1, GATA3, PBX1... préparent la chromatine au recrutement d'ER $\alpha$  au niveau des régions enhancers selon une multitude de combinaisons. A proximité d'un ERE peut se trouver un site FOXA1, seul ou accompagné d'un site GATA3, PBX1, il en va de même pour GATA3, pour PBX1... etc. Les enhancers sont enrichis en marques histone de type H3K27Ac ou encore H3K4me1/2. (B) Le dimère ER $\alpha$  formé par le ligand E2 interagit avec la chromatine, soit directement en se liant à son ERE, soit de manière indirecte par l'intermédiaire de facteurs de transcription (AP1, SP1, RUNX1...) qui vont permettre d'accrocher ER $\alpha$  au niveau de ces ERBS. (C) Le recrutement de cofacteurs transcriptionnels va permettre d'induire des modifications épigénétiques de la chromatine au niveau des histones, afin de rendre celle-ci permissive (H3K27Ac, H3K4Me3...) ou bien impropre à l'arrivée de la machinerie transcriptionnelle (H3K27Me3...). Les différents cofacteurs sont détaillés. (D) Une fois la chromatine devenue accessible, les complexes médiateurs et de pré-initiation peuvent être recrutés au niveau des enhancers et du promoteur proximal respectivement. (E) Le couplage physique entre le complexe des facteurs de transcription et le complexe de pré-initiation s'opère via le complexe Médiateur. La sous-unité MED1 interagit physiquement avec ER $\alpha$ , alors que les sous-unités MED 18 et 20 font le lien avec les facteurs généraux de la transcription. Cette représentation figée des différentes étapes de l'initiation de la transcription ne doit pas faire oublier leur caractère intrinsèquement dynamique, illustré notamment par le modèle des cycles successifs d'initiation de la transcription proposé par exemple par Métivier et al., 2003. (HMT : Histone MéthylTransférase, HAT : Histone AcétylTransférase, HDAC : Histone DéAcétylase, MED : Mediateur, TBP : TATA Binding Protein). Les complexes SP1 et AP1 (formés par les facteurs c-jun et c-fos) sont des complexes exprimés de façon ubiquitaire et sont impliqués dans la régulation de processus généraux tels que la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose.

## IV. Activités non-génomiques d'E2, relayées par ER $\alpha$

### 1. Découverte des effets « Non-Génomiques »

Les effets rapides des œstrogènes ont été pour la première fois identifiés par le laboratoire de Clara Szego en 1967. Elle a démontré que dans les secondes suivant un traitement aux œstrogènes, un flux calcique suivi d'une accumulation d'AMP cyclique s'opérait dans l'utérus des rongeurs (Szego and Davis 1967). Afin d'expliquer ces effets, l'hypothèse de la présence de récepteurs cytoplasmiques, localisés à la membrane plasmique est émise mais fera longtemps controverse.

L'équipe de Ferdinando Auricchio a énormément contribué à l'étude des effets non génomiques des E2. Durant les années 80/90, elle a établi un lien de cause à effet entre stimulation hormonale et apparition rapide de modifications post-traductionnelles au niveau d'ER $\alpha$  (Auricchio et al. 1984, 1987)(Migliaccio et al. 1984, 1986, 1993). Puis en 1996, elle démontre la genèse d'un complexe P21<sup>ras</sup>/c-SRC/ERK1-2 grâce à une activation rapide d'ER $\alpha$  par l'E2, ce qui est indispensable à l'enclenchement de la prolifération hormono-dépendante en lignée cellulaire MCF7 (Migliaccio et al. 1996). Cette publication offre une vision nouvelle du fonctionnement du récepteur aux œstrogènes que l'on croyait restreint à une activité transcriptionnelle classique. Ces mêmes auteurs démontreront un nombre considérable d'interactions et de modifications post-traductionnelles de kinases induites par l'E2, telles que l'association d'ER $\alpha$  avec la kinase c-SRC suite à une activation de PI3K, impliquée dans la prolifération hormono-dépendante des cellules MCF7 (Castoria et al. 2001).

En 1999, l'équipe d'Ellis Levin observe la présence d'ER $\alpha$  et d'ER $\beta$  (exprimés ectopiquement) au niveau membranaire dans des cellules CHO, et démontre que leur affinité pour le ligand E2 est identique aux récepteurs localisés au noyau (Razandi et al. 2003). La communauté scientifique commence donc à établir une connexion entre l'activation de multiples kinases intra-cytoplasmiques et la présence d'ER membranaires, on parle alors de MISS pour « Membrane Initiated Steroid Signaling ». Deux mécanismes principaux d'adressage des ER à la membrane ont été proposés (**figure 9**). Le premier implique une interaction avec la cavéoline (CAV1), une protéine membranaire localisée au niveau des radeaux lipidiques (Razandi et al. 2002). Le second repose sur la S-palmitoylation du récepteur au niveau d'un résidu Cystéine (Cys 447 - ER $\alpha$ ), favorisant son ancrage membranaire et son interaction avec la cavéoline 1 (Marino et al. 2006). Sous l'effet d'une stimulation à l'E2, ER $\alpha$  est dépalmitoylé et enclenche une cascade d'activation de kinases cytoplasmiques permettant la prolifération, notamment par l'activation de l'expression de la cycline D1 (Acconcia et al. 2005; Marino and Ascenzi 2008).

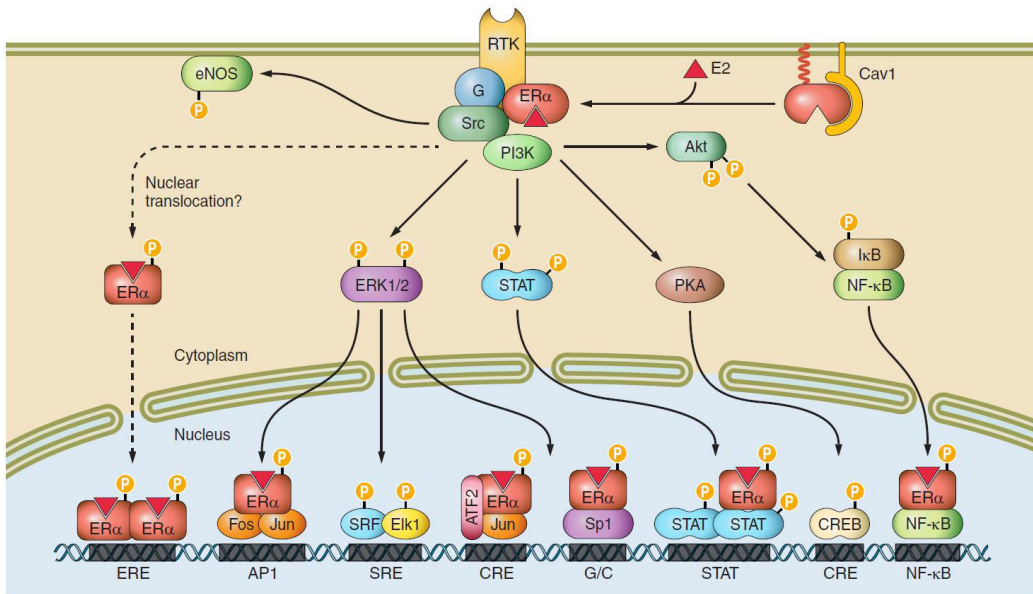


Figure 9 : Effets membranaires rapides ou « non-génomiques » initiés par ERα.

Une fraction cellulaire d'ERα est localisée au niveau cytoplasmique, voire même au niveau membranaire grâce à son interaction avec la cavéoline 1 et grâce à l'attachement d'un groupement palmitoyl via la cystéine 447 lui conférant une affinité pour la bicouche lipidique. Sous l'effet d'une stimulation à l'E2, les ERα peuvent interagir et activer de manière rapide des kinases telles que PI3K ou Src, aboutissant à l'activation en aval de kinases (ERK1/2, STAT...) et de facteurs de transcription (ELK1, AP1, SP1...) intégrant *in fine* au niveau génomique la signalisation initiée au niveau membranaire. On parle de MISS pour « Membrane Initiated Steroid Signaling ». (RTK : Récepteur Tyrosine Kinase). Figure extraite de la publication Arnal et al., 2017.

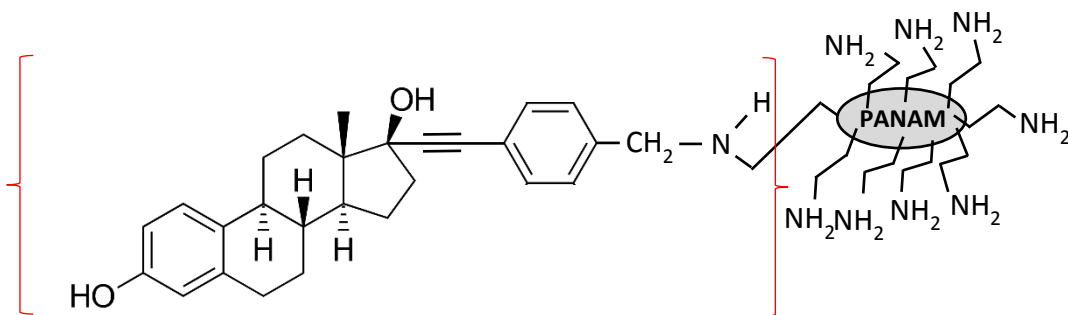


Figure 10 : Structure schématique de l'Estrogen Dendrimer Conjugate (EDC)

Par des approches *in vivo* chez la souris, il est clairement établi que le KO d'ER $\alpha$  mais aussi d'ER $\beta$  aboutit à la perte de régulation rapide par les œstrogènes (Pedram et al. 2006). L'équipe de Jean-Francois Arnal à l'UMR1048 de Toulouse a généré une lignée de souris mutantes pour la cystéine site de palmitoylation (451 chez la souris) afin de décortiquer de façon très fine ces MISS. Leur travail, publié dans PNAS, montre une prédominance des effets membranaires au sein du tissu ovarien, impactant la fertilité, mais également dans les cellules endothéliales. En effet, une perte de contrôle de la dilatation vasculaire par les E2 est observée, associée à une inhibition de la synthèse d'oxyde nitrique et du processus de ré-endothélisation. Ces auteurs montrent par ailleurs que la contribution des effets membranaires dans le tissu utérin est mineure (Arnal et al. 2010; Adlanmerini et al. 2014). De plus, les effets vasculaires protecteurs de l'E2 passent par ER $\alpha$  de manière AF1-indépendante, la forme 46 kDa, un variant d'ER $\alpha$ , étant tout à fait capable de garantir la production d'oxyde nitrique (Billon-Galés et al. 2009). Enfin, des études épidémiologiques ont montré que la prévalence de troubles du sommeil (apnée) augmente chez la femme ménopausée (Guidozzi 2013). Cela suggère un rôle protecteur des E2, rappelant les mêmes effets liés à la protection contre les accidents vasculaires cérébraux (Engler-Chiurazzi et al. 2015).

## 2. Intégration des effets non génomiques de l'E2 au niveau de la régulation génique

Des travaux réalisés par les groupes de Miguel Beato et de John & Benita Katzenellenbogen, ont montré que les effets non génomiques initiés au niveau cytoplasmique par l'E2 sont très largement intégrés au niveau génomique, ce qui remet légitimement en question la terminologie utilisée pour décrire ces effets rapides.

L'apparition de modifications post-traductionnelles initiées par la voie des facteurs de croissance, par exemple sur les résidus sérine 104, 106 & 118, a été montrée comme indispensable à l'activité génomique d'ER $\alpha$ , notamment pour le recrutement de co-activateurs transcriptionnels (Le Goff et al. 1994; Endoh et al. 1999; Rogatsky et al. 1999; Dutertre and Smith 2003; Sheeler et al. 2003; Medunjanin et al. 2005). En effet, un défaut de phosphorylation de ces résidus peut entraîner une chute de plus de 40% de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Le Goff et al. 1994). Ces modifications post-traductionnelles permettent en partie d'expliquer les phénomènes d'activation ligand indépendante d'ER $\alpha$  dans certains cas de résistance à l'hormonothérapie dans le cancer du sein.

Afin de dissocier rigoureusement les activités génomiques et non génomiques de l'E2, le laboratoire de John Katzenellenbogen a développé des conjugués oestrogéniques EDC pour « Estrogen

Dendrimer Conjugate » (**figure 10**) ayant la propriété de pouvoir traverser la membrane plasmique mais pas la membrane nucléaire et donc de n'activer que des ER cytoplasmiques (Harrington et al. 2006). L'analyse comparée des transcriptomes de cellules MCF7 traitées à l'E2 ou à l'EDC démontre qu'environ 25% des gènes répondant aux E2 répondent également à l'EDC (Madak-Erdogan et al. 2008). Par ailleurs, l'inhibition sélective des kinases PI3K, MAPK ou encore c-SRC par des inhibiteurs chimiques tels que le LY294002, le PD059 et le PP2 respectivement entraînent une dérégulation importante de la réponse transcriptionnelle induite par l'E2, de façon gène spécifique. Cela signifie que la signalisation oestrogénique interagit avec d'autres voies permettant la mise en place d'une réponse transcriptionnelle complète (Madak-Erdogan et al. 2008).

L'intégration des effets non génomiques de l'E2 au niveau de la chromatine est parfaitement illustrée par les travaux du laboratoire de Miguel Beato qui utilise comme modèle le promoteur du MMTV et le récepteur à la progestérone. Une étude publiée en 2006 montre qu'une stimulation à la progestérone induit une activation des kinases ERK1/2, entraînant la phosphorylation de PR et du facteur MSK1 (Thr 581) puis la formation d'un complexe PR/ERK/MSK1. L'enzyme MSK1 catalyse la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3Ser10ph), permettant l'éviction du facteur HP1 $\gamma$  et le recrutement de BRG1 et de l'ARN polymérase II (Vicent et al. 2006). MSK1 peut également être activée par les E2 dans le modèle T47D et son activation est requise pour permettre l'entrée des cellules en mitose (Reyes et al. 2014). Enfin, ils ont montré qu'une stimulation hormonale à la progestérone ou bien à l'E2 induit une réorganisation massive des domaines chromatiniens TAD afin de coordonner une réponse transcriptionnelle qui soit hormone spécifique (Le Dily et al. 2014).

En regard de ces travaux, il est donc difficile de dissocier fonctionnellement ces deux aspects de la signalisation oestrogénique tant ils convergent et participent de façon synergique à l'activation transcriptionnelle des récepteurs hormonaux en général. Que ce soit par modifications post-traductionnelles du récepteur, de ses partenaires, ou bien par modifications épigénétiques de la chromatine, les effets rapides des E2 sont très largement impliqués dans la mise en place de programmes transcriptionnels de prolifération, de différenciation et de survie.

### 3. Le récepteur GPR30

ER $\alpha$  et ER $\beta$  ont été pendant des décennies perçus comme les deux seuls récepteurs capables de fixer le ligand E2. Au cours des années 2000, un troisième candidat, GPR30, un récepteur couplé aux protéines G à sept domaines transmembranaires a été identifié comme tel, bien que son rôle dans l'intégration des effets membranaires des E2 demeure sujet à controverses. En effet, Filardo et al,

démontrent que l'activation du facteur GPER30 suite à une stimulation hormonale courte induit une activation des kinases ERK1 et ERK2 (Filardo et al. 2000). De plus, ces mêmes auteurs montrent que l'activation E2-dépendante de GPR30 induit une accumulation d'AMP cyclique qui inhibe l'activation des MAPK induites par la voie des facteurs de croissance de type EGF (Filardo et al. 2002). Ce récepteur a fait l'objet d'une publication dans Science, dans laquelle les auteurs démontrent par le biais d'un ligand E2 couplé à un fluorochrome une interaction avec le facteur GPR30 au niveau cytoplasmique. Cette interaction permet l'activation de la sous unité p85 du complexe PI3K, et pourrait ainsi être impliquée dans la mise en route de programmes prolifératifs (Revankar 2005).

Comme GPR30 et ER $\alpha$  coexistent dans de nombreux tissus, on peut s'attendre à une grande diversité d'interactions entre ceux deux récepteurs, telle qu'une synergie, une redondance ou bien un antagonisme de leur activité. Le scepticisme quant à ce récepteur provient d'études démontrant que dans certains modèles cellulaires, l'inactivation de GPR30 n'a aucun effet sur la réponse aux effets non génomiques déclenchés par l'E2. En effet, comme précédemment expliqué, Madak-Erdogan et al., ont démontré que l'utilisation d'EDC en cellules MCF7 permet l'expression de gènes spécifiquement répondeurs des effets membranaires de l'E2 (HSPB8, LRRC54, PMAIP). Or, le KO de GPR30 n'induit aucune modification de l'expression de ces gènes, alors que le KO du gène ESR1 codant ER $\alpha$  entraîne une perte totale de régulation (Madak-Erdogan et al. 2008). L'hypothèse d'une action tissu-spécifique de ce récepteur est donc privilégiée.

## V. Introduction générale au Cancer

L'histoire évolutive des organismes multicellulaires est et sera sempiternellement liée à l'histoire des pathologies cancéreuses, qui se complexifient à mesure que nous nous complexifions nous-mêmes. Les Hommes étudient cette pathologie depuis des centaines d'années, et le plus vieil article extrait de la recherche avec le mot-clé « tumour » dans PubMed remonte à 1809 ! Le cancer, c'est en quelque sorte la maladie du vivant. Parmi les milliards de divisions cellulaires qui s'opèrent tout au long de la vie d'un organisme, il en suffit d'une qui ne se passe pas selon le schéma prévu pour qu'une tumeur puisse apparaître et menacer l'intégrité d'un organisme entier. Beaucoup d'études à l'heure actuelle recherchent un déterminisme à l'apparition des tumeurs, par exemple lié aux polluants de l'environnement (perturbateurs endocriniens, cigarettes, particules fines...), aux radiations UV, aux ondes électromagnétiques, au stress... etc. Toutes ces causes existent bien évidemment et augmentent considérablement la prévalence de certaines pathologies cancéreuses, mais elles ne doivent pas faire oublier la part de hasard qui régit l'émergence de tumeurs. En 2015, une étude publiée dans Science

par Bert Vogelstein fit grand bruit et démontra que peu importe la région géographique considérée, l'étiologie du cancer pouvait s'expliquer par le nombre de divisions cellulaires dans un organe donné (Tomasetti et al. 2015). De ce fait, des erreurs récurrentes liées à la réplication du génome s'accumulent de façon aléatoire au sein des cellules souches, ce qui mène inexorablement à la pathologie tumorale (**figure 11**). C'est d'une certaine manière la loi de Murphy, «tout ce qui est susceptible de mal tourner, tournera nécessairement mal». Ces auteurs, et d'autres tout aussi illustres comme Robert Weinberg, soutiennent également la thèse controversée selon laquelle il n'existe pas de mutations causales pour la dissémination métastatique et l'enclenchement de programmes de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Le détournement du programme EMT, activé au cours de l'embryogénèse ou de la cicatrisation par exemple, serait à imputer uniquement à une reprogrammation épigénétique et non à un déterminisme lié aux mutations. Par ailleurs, un des grands axes de la recherche tend aujourd'hui à comprendre comment des cancers traités des années auparavant peuvent ressurgir dans un organe distant du premier après dissémination métastatique. L'hypothèse d'un processus de dormance est avancée et offre une nouvelle vision des divers états que peuvent prendre des cellules cancéreuses afin de survivre à travers les années (Malladi et al. 2016). Le professeur Harold Dvorak a joliment résumé la pathologie cancéreuse par cette phrase : « Cancer is a wound that would not heal ».

Bien sûr la recherche continue à se focaliser sur la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, mais un autre volet en plein essor vise à comprendre comment se mettent en place les mécanismes de résistance aux thérapies utilisées. En effet, la tumeur détourne à son profit une grande diversité des mécanismes (sélection clonale, dissémination, évasion immune, sécrétome...), ce qui lui confère sa capacité à survivre malgré un environnement rude (**figure 12**). Cela illustre parfaitement le « struggle for life » Darwinien, à une échelle accélérée. Comprendre les mécanismes de rechutes, c'est pouvoir mieux les anticiper et donc mieux les contrecarrer. C'est dans cet esprit que s'inscrit modestement ce travail de thèse, en prenant comme sujet d'étude, les cancers du sein ER $\alpha$  positifs.



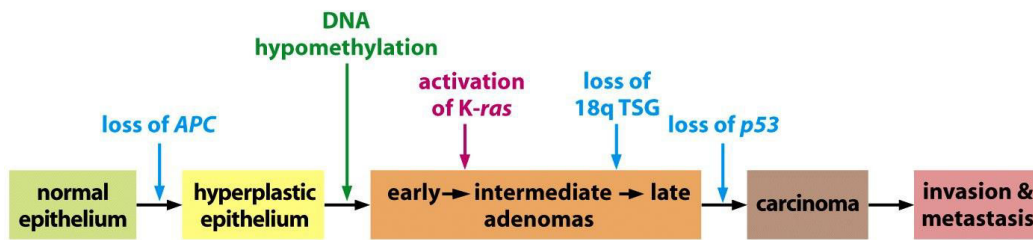


Figure 11 : Modèle d'accumulation de mutations génétiques successives menant à l'apparition d'un cancer du colon

APC Adenomatous Polyposis Coli; TSG Tumor Suppressor Gene.

D'après The Biology of cancer, Garland sciences 2007, Chapitre 11, RA Weinberg

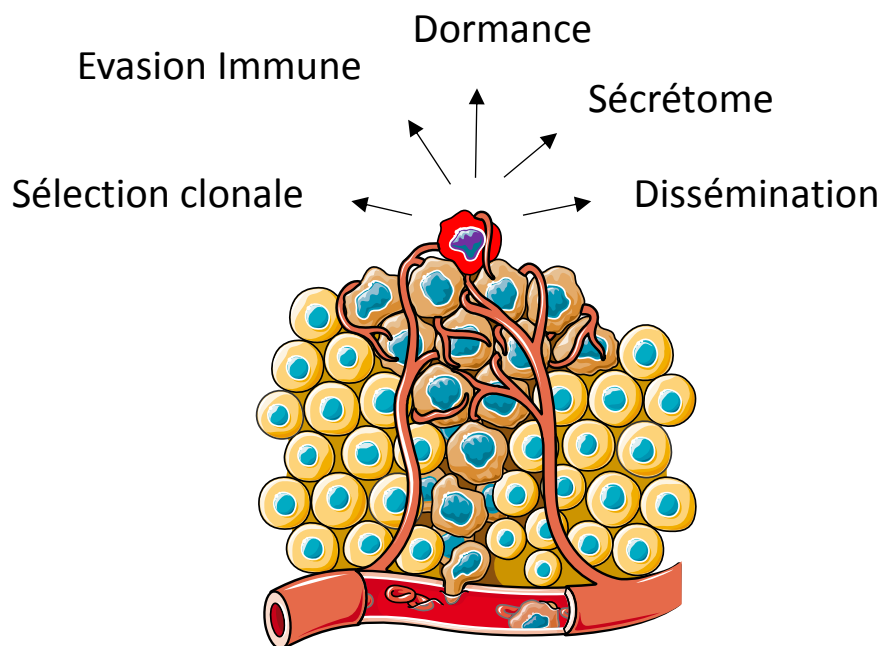


Figure 12 : Diversité des mécanismes de résistance détournés par les cellules tumorales (Utilisation d'items de Servier Medical Art)

## VI. Le Cancer du Sein

### 1. Généralités et données épidémiologiques

Le cancer du sein est une pathologie très hétérogène, que ce soit en termes histologiques, en termes de réponses thérapeutiques ainsi que de survie à long à terme. Mais soyons positifs, le pronostic de survie après un cancer du sein ne cesse de s'améliorer à mesure qu'il est diagnostiqué et traité tôt. En effet, le taux de rémission s'est nettement amélioré (survie nette à 5 ans > 87%, données INCA), et l'on peut expliquer ce constat par deux facteurs majeurs : les progrès thérapeutiques réalisés au début des années 2000 et une augmentation de la proportion des cancers découverts à un stade précoce en lien avec le développement des pratiques de dépistage. Mais malgré ces chiffres encourageants, le cancer du sein demeure le second cancer le plus fréquent (après le cancer du poumon) et le plus fréquemment détecté chez la femme, avec plus d'un million de nouveaux cas chaque année dans le monde, dont plus de 50 000 rien qu'en France (données de la Ligue contre le Cancer). Dans les pays industrialisés, c'est approximativement 1 femme sur 8 qui développera un cancer du sein au cours de sa vie. Cette observation marquante contraste avec les faibles taux d'apparition du cancer du sein dans les pays de l'Asie du sud-est et les pays d'Afrique, comme cela est illustré en **figure 13**, ce qui pose la question de notre mode de vie.

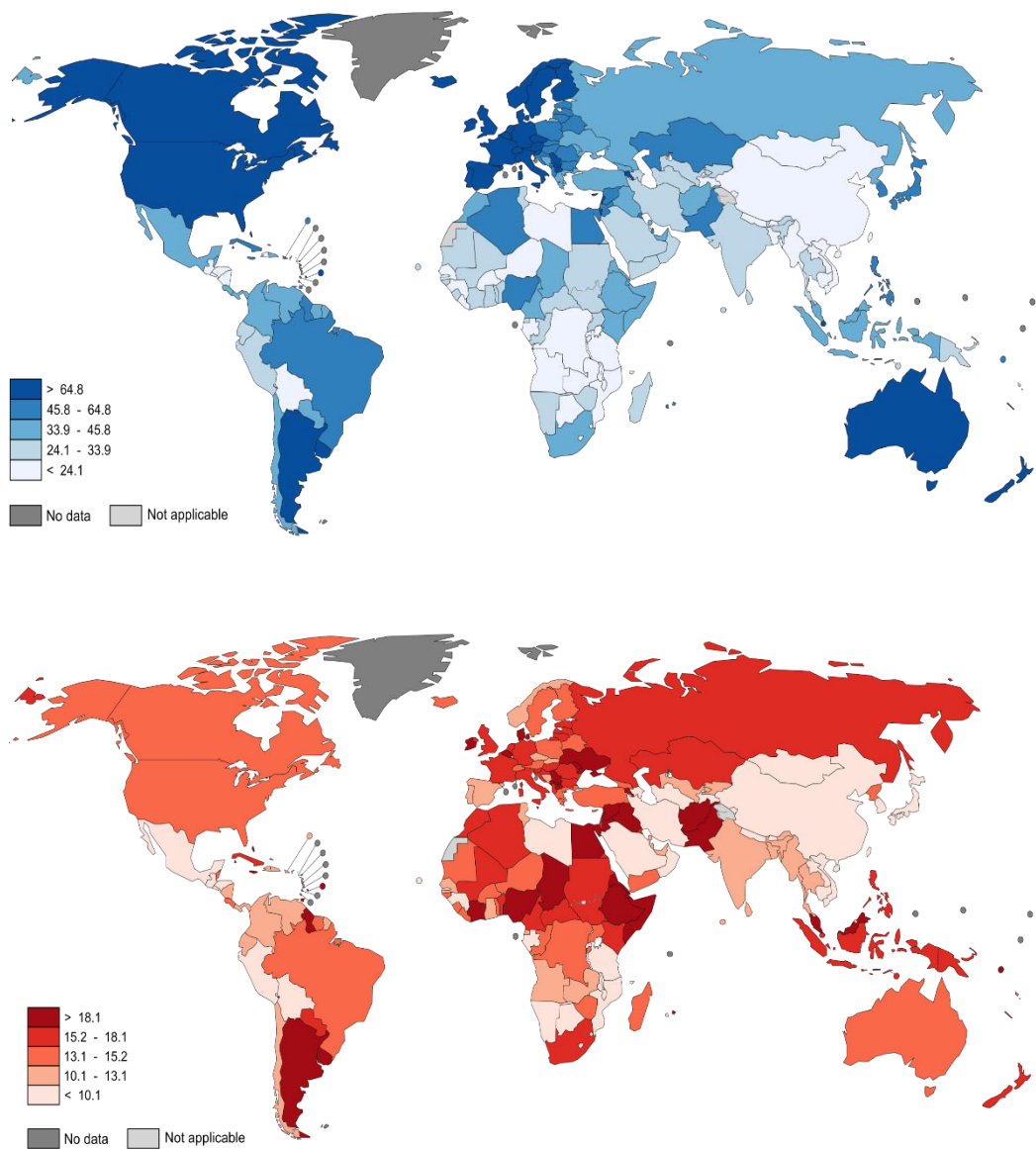
### 2. Facteurs de risque

Aux mutations héréditaires (BRCA1...) et aux mutations spontanées à haute pénétrance (p53...), (Nik-Zainal et al. 2016; Rheinbay et al. 2017) (**figure 14**), s'ajoute une multitude de facteurs de risques qui contribuent à l'apparition de la pathologie cancéreuse mammaire, le premier d'entre eux étant tout simplement l'âge (Russo et al. 1982; Mahoney et al. 2008). Les risques de développer un cancer du sein chez la femme augmentent ostensiblement lors d'une période bien précise de leur vie, la ménopause, au cours de laquelle s'opère une chute du taux d'œstrogènes circulants, prédisposant à la maladie (Thomas et al. 1997). D'ailleurs, plus l'âge de la ménopause ou de la première grossesse est tardif et plus les premières règles arrivent précocement, plus les risques augmentent. De plus, afin de pallier les divers effets indésirables de la ménopause, certaines femmes ont recours aux thérapies substitutives ou HRT « Hormone Replacement Therapy », ce qui augmente significativement le taux d'apparition des tumeurs entre 50 et 75 ans (Steinberg et al. 1991). Il en va de même pour l'utilisation de contraceptifs oraux. A ces facteurs l'on peut rajouter l'obésité, notamment chez la femme

ménopausée, ou encore des pratiques telles que le tabagisme et la consommation régulière d'alcool (Singletary 2003; Zhang et al. 2007).

A l'inverse il existe des facteurs protecteurs, parmi lesquels on peut citer la pratique de l'activité physique régulière, l'âge précoce de la grossesse et l'allaitement à long terme (Mahoney et al. 2008). De façon surprenante, on remarque, malgré un fort développement industriel des pays asiatiques (Chine, Inde...), une prévalence beaucoup plus faible du cancer du sein dans ces régions. La clé de ce paradoxe apparent réside probablement dans le mode de vie des populations asiatiques et plus particulièrement dans leur alimentation. En effet des méta-analyses soulignent un lien entre alimentation végétale, notamment à base de soja, et les effets protecteurs vis-à-vis du cancer du sein (Shu et al. 2001; Wu et al. 2002; Trock et al. 2006).

Enfin, il est important de noter que le cancer du sein ne touche pas exclusivement les femmes, mais également les hommes dans de rares cas (0.1% à 1% des cas, INCA), souvent de façon héréditaire.



**Figure 13: Incidence (bleu) et Mortalité (rouge) du cancer du sein au niveau mondial**

Les chiffres sont exprimés en taux pour 100 000 personnes. La comparaison des cartes met en évidence la forte incidence du cancer du sein dans les pays industrialisés, sans que celle-ci ne se traduise par une forte mortalité. Les forts taux de mortalité sont observés principalement dans les zones géographiques les moins développées.

(<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>)

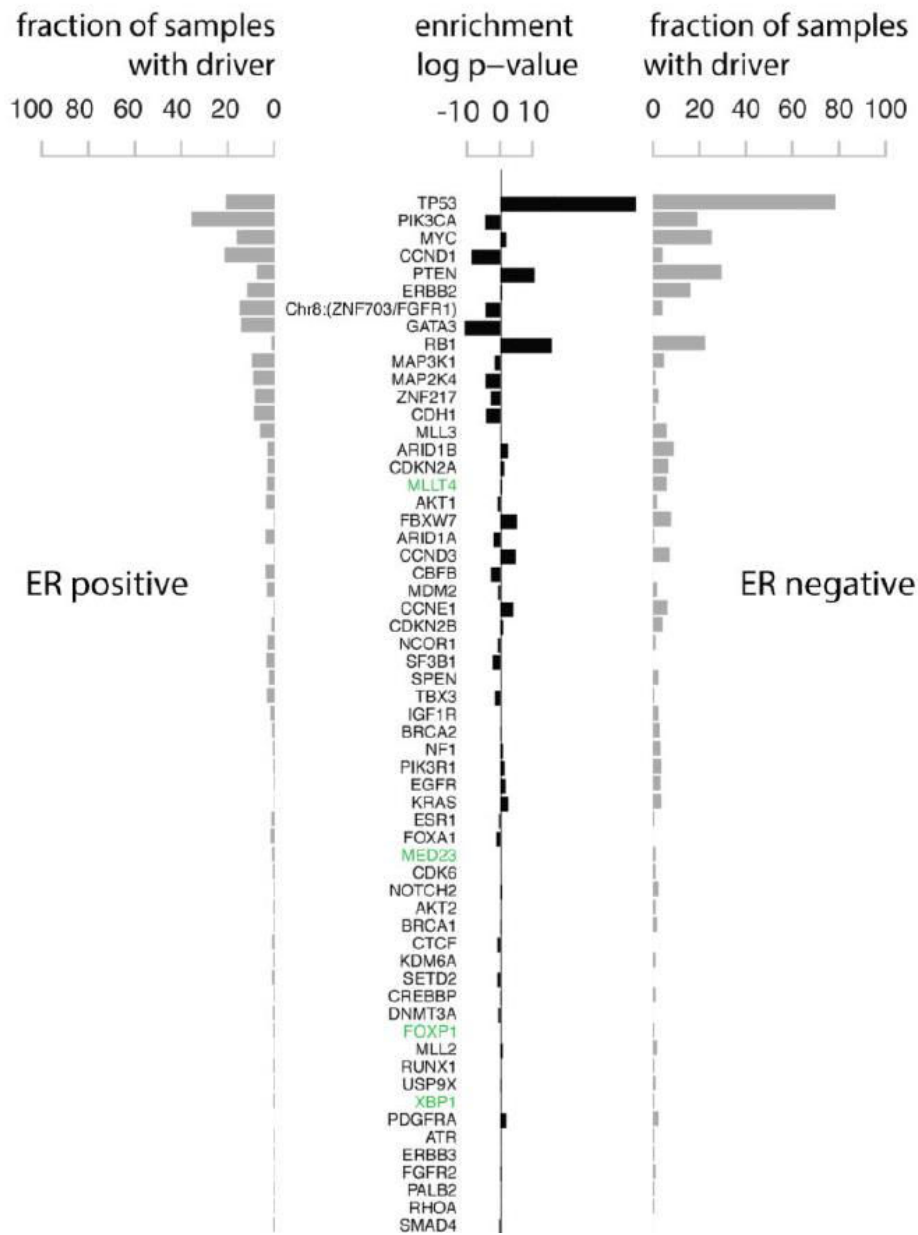


Figure 14 : Catalogue de mutations somatiques dans 560 cas de cancer du sein.

Liste de mutations "driver" classées par fréquence d'apparition. Au total 366 tumeurs ERα positives et 194 tumeurs ERα négatives ont été séquencées par la méthode d'exome. Les graphes gris identifient la fraction des tumeurs possédant la mutation correspondante pour chacun des deux types. Les graphes noirs représentent la prévalence en mutations pour chaque gène entre les deux types de tumeurs (Log10p-value). Ce graphe montre que certaines mutations plus représentées dans un type de tumeur et inversement. Les gènes en vert sont les derniers "drivers" identifiés en date. Tiré de Nik-Zainal et al. 2016.

### 3. Le cancer du sein : du carcinome *in situ* au stade métastatique

#### *i. La glande mammaire*

Avant d'entamer la description précise des différents types de tumeurs de sein et de leur mode de traitements, une description de la glande mammaire, foyer d'émergence des tumeurs mammaires, s'impose (**figure 15**). Anatomiquement la glande mammaire est une glande exocrine qui possède une structure arborescente constituée d'environ une quinzaine de lobes glandulaires et de canaux dits galactophores, car responsables du transport du lait jusqu'à la papille mammaire (Skibinski and Kuperwasser 2015). Ces lobes sont entourés de tissu adipeux plus ou moins abondant et sont hautement vascularisés. L'épithélium mammaire qu'il soit canalaire ou lobulaire est constitué de deux couches de cellules (**figure 16**). Une couche luminale, au sein de laquelle une fraction de cellules exprime les récepteurs hormonaux tels que les récepteurs aux œstrogènes ou à la progestérone. Par ailleurs, les cellules lumineales possèdent une activité de sécrétion du lait dans la lumière du canal à partir du lobe. La seconde couche externe de l'épithélium est dite basale ou myoépithéliale, elle possède une activité de contraction musculaire permettant le déclenchement mécanique de la sécrétion du lait. L'épithélium est entouré d'une lame basale ainsi que d'un stroma, composé principalement de fibroblastes et d'adipocytes, le tout formant le lobe. Enfin, il a été démontré qu'au sein de la couche épithéliale résidaient des cellules souches dites MaSC « Mammary Stem Cells », par le biais d'expériences de transplantation de fragments d'épithélium capables de régénérer une structure arborescente de glande mammaire dans une souris dépourvue de glande mammaire (Guo et al. 2012; Ye et al. 2015).

Les différents types cellulaires au sein de la glande mammaire se différencient par l'expression de marqueurs spécifiques, tels que les récepteurs hormonaux, les cytokératines, des marqueurs de surface ou encore des facteurs de transcription. En effet, on peut marquer spécifiquement des cellules lumineales avec des récepteurs ER $\alpha$  ou PR, les cytokératines 8 & 18, la molécule de jonction EpCam, ou encore les facteurs pionniers GATA3 et FOXA1. Les cellules basales sont identifiables par l'expression des cytokératines 5, 14 & 17 ou encore via des marqueurs de contraction, comme l'actine de muscle lisse ( $\alpha$ SMA), ou bien encore des facteurs de transcription comme SLUG. Enfin, plusieurs études se sont focalisées sur la caractérisation moléculaire des MaSC de manière approfondie chez la souris et ont notamment identifié une sous population de cellules CD49f high/EpCam+/CD61+/ALDH+ capables de redonner une structure typique de la glande mammaire dans des souris dépourvues de glande mammaire (Kuperwasser et al. 2004; Asselin-Labat et al. 2008; Guo et al. 2012).

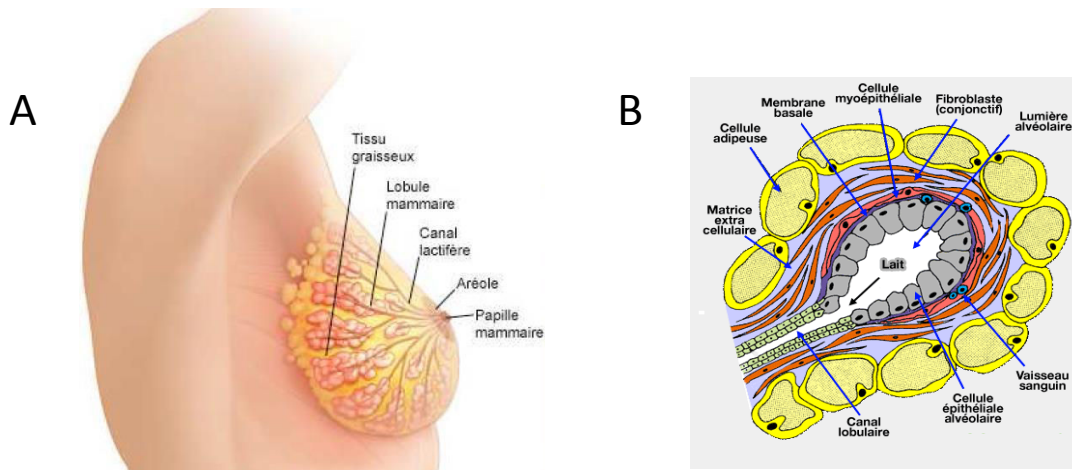


Figure 15 : Anatomie du sein chez la femme (A) et structure schématique d'un acinus ou d'une alvéole mammaire (B).

Tirés (A) des cours de médecine Yolande maisonnette et Jean Loup Sautière (Besançon) et de (B) vetopsy.fr, d'après Delouis.

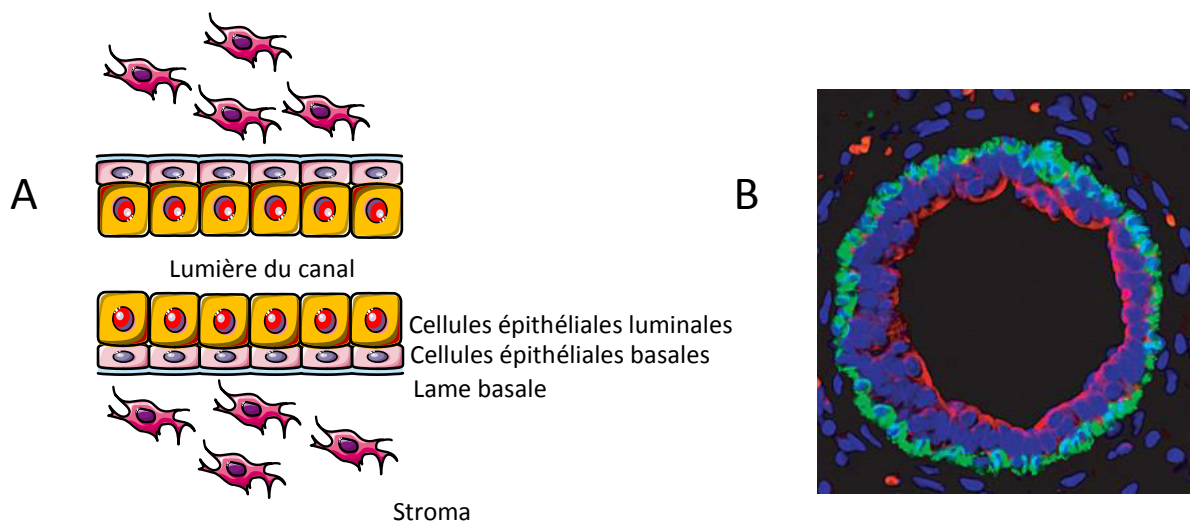


Figure 16 : L'épithélium mammaire.

Schéma illustrant la stratification de l'épithélium mammaire (A) et Immunofluorescence de l'épithélium mammaire murin en coupe transversale (B). La couche luminaire de l'épithélium mammaire est détectée en rouge par immuno-marquage de la cytokératine 18. La couche basale de l'épithélium est quant à elle détectée en vert par immuno-marquage de la cytokératine 14. Les noyaux sont marqués au DAPI et visible en bleu. Ce marquage démontre explicitement que chacune des couches épithéliales peut être discriminée l'une de l'autre à l'aide de marqueurs spécifiques qui signent les deux états de différenciation. Utilisation d'items de Servier (A), tiré du « department of pathology » de l'université de Cambridge (B).

## ii. Diagnostique initial et développement de la pathologie

Le processus de cancérisation est majoritairement initié au sein de l'épithélium mammaire, ce qui aboutit à la formation d'un carcinome (terme désignant une tumeur issue de cellules épithéliales) et plus généralement d'un adénome (terme désignant une tumeur dérivant d'une glande). Une fois le néoplasme identifié, les médecins utilisent deux types de classifications, TNM et SBR, pour caractériser la tumeur. La première, TNM, pour « Tumor Nodes Metastasis », catégorisée en 4 stades de malignité, vise à déterminer la taille de la tumeur, le degré d'infiltration ainsi que l'atteinte aux ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases. Enfin la seconde classification, SBR pour « Scarf Bloom & Richardson », permet de classer la tumeur selon 3 grades de malignité en prenant en compte l'index prolifératif (Ki67), l'architecture tumorale ainsi que la taille et la forme des noyaux. Ensuite, les médecins effectuent des biopsies afin de rechercher des marqueurs moléculaires qui détermineront d'un part le type de tumeur (détaillé un peu plus loin) ainsi que le traitement qui sera administré. Parmi ces marqueurs, les trois principaux sont bien évidemment ER $\alpha$ , le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur HER2/Neu/ERBB2.

Les carcinomes lobulaires ou bien canaux sont dits *in situ*, car ils correspondent à un stade relativement précoce de la maladie. En effet, la tumeur est relativement différenciée, les cellules conservent une polarité apico-basale et expriment des molécules de jonctions comme l'E-cadhérine. Le carcinome est dit invasif et infiltrant lorsque les cellules tumorales commencent à envahir l'organe après rupture de l'enveloppe basale, puis traversent l'enveloppe des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules cancéreuses, disséminées au sein de l'organisme, peuvent alors réactiver un programme prolifératif dans un organe distant, tel que le foie, les os ou les poumons : on parle alors de cancer métastatique (**figure 17**).

## iii. Cancer métastatique

La cascade invasion/métastase (**figure 17**) est un processus par lequel une cellule ou un groupe de cellules du site tumoral primaire perd ses capacités d'adhérence, acquiert des capacités migratoires et invasives, et colonise un site distant du site originel par le biais de la circulation sanguine ou lymphatique (Lambert et al. 2017). Afin de permettre leur dissémination, les cellules cancéreuses détournent un programme de transition épithélio-mésenchymateuse, orchestré par des facteurs de transcription spécifiques tels que ZEB1, SNAIL, SLUG, TWIST et SOX9, ainsi que par un arsenal de facteurs de remodelage de la matrice extracellulaire, dans lequel les métallo-protéases MMP jouent



une rôle crucial (Chiang and Massagué 2008; Massagué and Obenauf 2016). L'absence de mutations dans les gènes codant ces facteurs incite la communauté scientifique à privilégier l'hypothèse d'un déterminisme épigénétique et non génétique pour l'activation de l'EMT. Outre l'hypothèse des cellules souches cancéreuses CSC pour « Cancer Stem-Cells », capables à la fois d'avoir des propriétés tumorigéniques TIC pour « Tumour Initiating Cells », et métastatiques (Ye et al. 2015), il existe un nombre considérable de facteurs, notamment liés au microenvironnement tumoral, capables d'induire une reprogrammation cellulaire menant à l'EMT. Parmi ces facteurs, on peut citer les cellules stromales sécrétrices de TGF $\beta$ , facteur qui tel le Dieu Janus possède deux facettes apparemment opposées vis à vis du cancer, en exerçant une activité antiproliférative tout en étant capable d'induire des caractéristiques malignes et invasives (Massagué 2008). On peut citer également l'activation des voies Rho-GTPase, de la voie Wnt, de la voie Notch, ou bien encore l'hypoxie (Semenza 2012; Orgaz et al. 2014), qui fera l'objet d'une description détaillée dans la suite de ce manuscrit.

Dans le cas des tumeurs mammaires, l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques de la tumeur permet non seulement d'adapter le traitement qui sera mis en place mais permet également de prédire où la tumeur pourra préférentiellement métastaser (Sihto et al. 2011). Les tumeurs de sein montrent une affinité particulière à développer des métastases au niveau des os, du foie, des poumons et du cerveau (Felipe Lima et al. 2016). Les mécanismes moléculaires responsables de l'affinité des cancers du sein pour ces sites sont extrêmement complexes. Il a par exemple été démontré que les tumeurs mammaires exprimant de fortes quantités de Tenascin C et d'angiopoietine-like 4 (ANGPTL4) métastasent préférentiellement dans les poumons (Padua et al. 2008; Oskarsson et al. 2011). D'une manière générale, ces différents organes ont en commun la particularité d'exprimer fortement la chimiokine SDF1 « Stromal Cell-Derived Factor 1 » (CXCL12). Les cellules cancéreuses exprimant des forts taux de son récepteur CXCR4 seront attirées par chimiotactisme et coloniseront plus fortement ces différents sites (Luker et al. 2012).

Lorsque la maladie atteint le stade métastatique, quel que soit le cancer dépisté, les taux de survie chutent drastiquement. On estime que 90% des décès liés au cancer sont le fait d'un développement métastatique de la maladie. Il est donc essentiel d'améliorer les techniques de dépistage ainsi que de développer des thérapies adaptées afin d'accroître l'espérance de vie des patients en bonne santé.

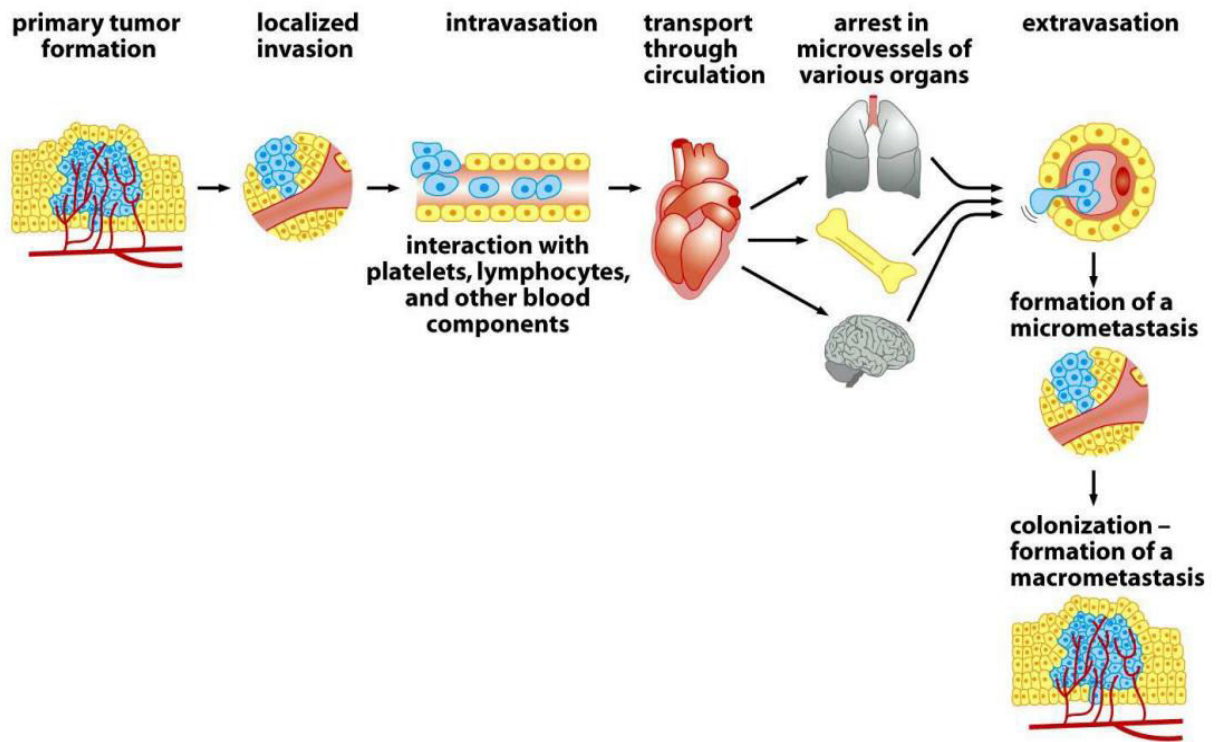


Figure 17: Représentation schématique de la cascade Invasion/Métastase dans le cancer.  
 D'après The Biology of cancer, Garland sciences 2007, Chapitre 14, RA Weinberg

#### 4. Les différents types de tumeurs mammaires & traitements associés

Les avancées technologiques, notamment en matière d'analyses transcriptomiques ont permis d'établir une classification des cancers du sein en 5 grands sous types (Carey et al. 2006; Guiu et al. 2012; Viale 2012) :

- Luminal A (60% des cas)
- Luminal B (15% des cas)
- HER2-Enriched (10% des cas)
- Claudin-Low (5% des cas)
- Basal-like (10% des cas)

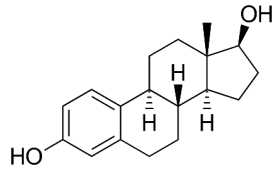
Les plus fréquemment détectés sont les tumeurs de types Luminal A et chacun de ces sous-types possède des caractéristiques intrinsèques qui vont conditionner l'approche thérapeutique qui sera utilisée (Prat and Perou 2011). Les tumeurs de type luminal expriment toutes des marqueurs de cellules épithéliales tels que GATA3, FOXA1 et ER $\alpha$ , dans des fortes proportions pour le sous-type A et dans des proportions plus faibles pour le sous-type B. De plus les tumeurs classées lumineales B possèdent un index prolifératif beaucoup plus fort et sont moins sensibles à l'hormonothérapie qui représente le traitement de choix. En effet, les tumeurs lumineales, du fait qu'elles expriment ER $\alpha$  et/ou PR, ont un mode de prolifération dit hormono-dépendant car la croissance tumorale repose principalement sur l'effet prolifératif des œstrogènes et dans un degré moindre de la progestérone. L'hormonothérapie est généralement administrée de façon post-opératoire pour réduire le risque de rechute, et peut également être proposée dans le cas des cancers métastatiques en complément de la chimiothérapie pour freiner la croissance tumorale. Il existe deux types d'hormonothérapie :

1) L'hormonothérapie dite compétitrice repose sur des molécules (**figure 18**) qui vont entrer en compétition avec l'E2 pour lier ER $\alpha$  et inhiber son activité. Ces molécules peuvent être des antagonistes purs tels que le fulvestrant (ICI 182,780), molécule très efficace qui n'a cependant aucune spécificité d'action tissulaire. Il peut s'agir également de molécules SERM pour « Selective Estrogen Receptor Modulator » qui possèdent cette fois une véritable spécificité d'action selon le tissu considéré. La plus connue et la plus utilisée est bien sûr le tamoxifène (Novaldex) qui sous sa forme active 4-hydroxy, entraîne l'arrêt de la prolifération tumorale en exerçant une activité antagoniste sur le récepteur dans le tissu mammaire. Le tamoxifène possède également une activité agoniste dans les os et exerce donc

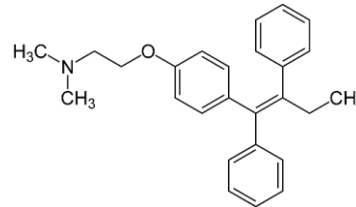
des effets protecteurs vis-à-vis de l'ostéoporose. Malgré une activité agoniste dans l'épithélium utérin, augmentant légèrement la prévalence des cancers dans cet organe, le tamoxifène demeure la thérapie de référence depuis plus de 30 ans (Jordan 2003). On peut citer également le raloxifène, molécule également très utilisée car dépourvue d'effets agonistes dans l'utérus (DeMichele et al. 2008).

2) L'hormonothérapie suppressive vise quant à elle à bloquer ou à réduire la production d'œstrogènes circulant dans le corps. Il existe une approche chirurgicale, en réalisant une ovariectomie qui abolit de façon complète et irréversible la production d'œstrogènes et de progestérone. Cet acte revient à imposer une ménopause abrupte au corps, avec tous les effets indésirables que cela suppose, à savoir bouffées de chaleur, augmentation des risques d'ostéoporose, d'AVC et de troubles du sommeil, et n'est donc que rarement réalisé. Pour l'anecdote, cette solution est ancestrale puisqu'on retrouve des écrits datant du 19<sup>ème</sup> siècle montrant son efficacité pour traiter certains cancers mammaires (Beatson 1896). Il existe des thérapies médicamenteuses plus adaptées et aux effets réversibles, par exemple, l'injection d'inhibiteurs de l'aromatase, enzyme qui convertit la testostérone en œstrogènes, à base d'exémesthane, de létrozole ou encore d'anastrozole. Il existe également des thérapies à base d'agonistes de la LH-RH (ou GnRH) ayant pour effet d'hyper-stimuler l'hypophyse, qui finira par ne plus répondre et ne plus produire de LH, hormone stimulatrice de la production des E2 au niveau des ovaires : on parle de suppression ovarienne.

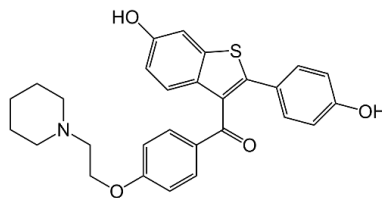
**Œstradiol**



**Tamoxifène (Novaldex) : SERM**



**Raloxifène (Evista) : SERM**



**ICI 182 780 (Fulvestrant) : SERD**

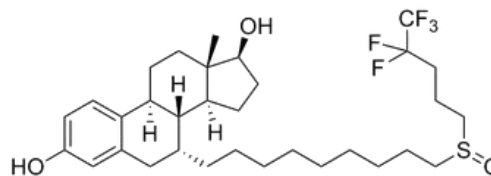


Figure 18 : Représentation schématique de l'œstradiol et des principales molécules utilisées en thérapie hormonale.

Le tamoxifène et le raloxifène commercialisés sous les noms de Novaldex et d'Evista respectivement, sont des SERM « Selective Estrogen Receptor Modulator » car ces molécules possèdent une spécificité d'action tissulaire. L'ICI 182 780 commercialisé sous le nom de Fulvestrant est quant à lui un antagoniste pur qualifié de SERD « Selective Estrogen Receptor Downregulator » car il induit la dégradation d'ER $\alpha$ .

Pour le cas de tumeurs présentant un taux élevé de récepteur aux facteurs de croissance HER2, des progrès considérables ont été réalisés depuis le développement d'un anticorps monoclonal antagoniste de ce récepteur : le Trastuzumab (Herceptin). Certaines tumeurs luminales B peuvent également sur-exprimer HER2 et donc bénéficier de cette thérapie. Des inhibiteurs des kinases CDK4/6 commencent également à être utilisés pour traiter ces cancers, ainsi que les tumeurs de type luminal (Goel et al. 2016).

Les cancers de type basal, dénommés ainsi car ils dérivent de la couche basale de l'épithélium mammaire, sont des cancers généralement beaucoup plus agressifs que les cancers luminaux, ayant une plus forte prévalence chez les femmes jeunes (Toft and Cryns 2011). Les cancers de type basal-like regroupent une sous-catégorie de cancers dit triples négatifs, TNBC pour « triple negative breast cancer », car ils n'expriment ni ER $\alpha$ , ni PR, ni HER2. Par ailleurs, ces cancers TNBC ne sont pas nécessairement de type basal-like (uniquement 70% d'entre eux) car ils n'expriment pas systématiquement des marqueurs typiques tels que les cytokératines de haut poids moléculaire 5, 6, 14 & 17, la p-cadhérine, le marqueur CD10, ou le récepteur HER1 (Nielsen et al. 2004; Arnes et al. 2005; Prat et al. 2013). De plus, 70% des cancers du sein mutés pour BRCA1 sont classés dans la catégorie basal-like, qui par ailleurs présentent de très forts taux de mutations pour l'oncogène p53 et le suppresseur Rb (Badve et al. 2011; Rheinbay et al. 2017). Les options thérapeutiques pour ce type de cancer sont assez limitées et se résument à des interventions chirurgicales, de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Paclitaxel...). Le cancer de type Claudin-Low a été la dernière catégorie de cancers du sein à avoir été identifiée. Ces tumeurs sont suspectées de dériver de cellules souches mammaires car elles expriment des marqueurs tels que CD44, ALDH1 « Aldéhyde Déshydrogénase 1 » et PROCR « Protein C Receptor » en forte quantité (Charafe-Jauffret et al. 2009a, b). Elles expriment également des marqueurs mésenchymateux tels que la vimentine ou le facteur de transcription TWIST, ce qui pose la question de la proximité de l'état souche et de l'état mésenchymateux (Taube et al. 2010). Par ailleurs ces cancers expriment faiblement les claudines qui sont des molécules de jonctions intercellulaires épithéliales, ainsi que des marqueurs luminaux tels que GATA3, les récepteurs hormonaux, ou encore le récepteur HER2. On retrouve donc des cancers de la catégorie TNBC au sein de ce sous-type claudin-low (Prat and Perou 2011). Comme pour les cancers de type-basal-like, les options thérapeutiques sont limitées, bien que ces tumeurs présentent une sensibilité accrue à la chimiothérapie (Prat et al. 2010).

Selon le grade tumoral et la présence de marqueurs spécifiques, tels que HER2, les thérapies précédemment décrites peuvent être utilisées seules ou en combinaison sur des durées plus ou moins

longues avec des doses plus ou moins fortes, afin d'optimiser le rapport bénéfice/risque des patientes (Tryfonidis et al. 2016). Le taux de survie varie énormément d'un sous type à l'autre, les cancers de type TNBC étant ceux pour lesquels les taux de rémission sont les plus faibles. De plus, on observe une forte incidence des cas de résistance à l'hormonothérapie dans les cancers de type luminal (environ 30 à 40%) avec des mécanismes extrêmement variés qui seront détaillés plus loin dans cette introduction.

La recherche de combinaisons de traitements toujours plus efficaces pour enrayer la pathologie est actuellement en plein essor avec l'explosion des modèles PDX pour « Patient Derived Xenografts » (Dobrolecki et al. 2016). La greffe immédiate de fragments tumoraux issus de patientes atteintes de cancer du sein dans des souris immunologiquement humanisées offre des perspectives thérapeutiques infinies dans le but de tester et d'identifier des thérapies pertinentes et percutantes. Une banque de données qui recense toutes les combinaisons testées en fonction des types de tumeurs a même été récemment développée (Bruna et al. 2016) (<http://caldaslab.cruk.cam.ac.uk/bcape/>).

## 5. Rôles majeures de l'E2 et d'ER $\alpha$ dans la prolifération des cellules tumorales mammaires

Le rôle du récepteur aux œstrogènes dans l'homéostasie tissulaire de la glande mammaire est essentiel. Des expériences de greffe d'épithélium issu de souris témoins et KO ER $\alpha$ -/- montrent que seules des cellules provenant de souris sauvages sont capables de redonner une structure arborescente de glande mammaire dans les souris transplantées (Mallepell et al. 2006). Chez l'homme, les cellules exprimant ER $\alpha$  dans la glande mammaire sont principalement de type luminal et sont capables de capter le signal oestrogénique sans y répondre de façon autocrine. En effet, approximativement 10% des cellules luminales terminalement différenciées expriment ER $\alpha$  et ont une activité de sécrétion pour une multitude de facteurs de croissance qui vont participer au maintien de l'état différencié et au renouvellement de l'épithélium mammaire de façon paracrine (**figure 19**). Parmi ces facteurs, on peut citer l'amphiréguline (AREG) dont le KO en souris impacte gravement le développement de la glande mammaire (Ciarloni et al. 2007). L'amphiréguline appartient à la famille des EGF et est un relai majeur de l'E2 dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales mais également stromales qui expriment l'EGFR. Sous l'effet de l'AREG, les cellules stromales sécrètent des facteurs tels que l'IGF1 « Insulin Growth Factor 1 », l'HGF « Hepatocyte Growth Factor » ou bien des facteurs de la famille des FGF « Fibroblast Growth Factor » qui complexifient le réseau de régulation

paracrine de renouvellement des cellules de la glande mammaire initié par les E2 (Tanos et al. 2012). On peut citer également la chimiokine CXCL12/SDF1 contribuant à la prolifération des cellules cancéreuses mammaires exprimant CXCR4 ou CXCR7 (Luker and Luker 2006; Boudot et al. 2011), ou bien encore des IGF et des IGF-BP (Fagan and Yee 2008).

Il faut bien avoir à l'esprit que dans une situation non pathologique, le contrôle de la prolifération cellulaire par les E2 s'exerce de façon paracrine via les facteurs sécrétés par les cellules ER $\alpha$  (+). Les cellules ER $\alpha$  (+) ne prolifèrent pas, et d'ailleurs en absence de ligand, ER $\alpha$  régule majoritairement des gènes impliqués dans la différenciation épithéliale mammaire plutôt que gènes reliés à la prolifération (Caizzi et al. 2014). Or la vaste majorité des tumeurs ER $\alpha$  (+) sont formées par un nombre important de cellules exprimant ER $\alpha$ , ce qui témoigne de leur prolifération anormale. L'effet des E2 est donc double sur ces cellules : levée de l'effet frein d'ER $\alpha$  sous sa forme non-ligandée et induction de l'expression de facteurs intracellulaires pro-prolifératifs. Les mécanismes qui régissent ce basculement demeurent très peu compris. En effet, les cellules ER $\alpha$  (+), sous l'effet de l'E2, expriment des facteurs déterminants pour l'entrée en mitose tels que la cycline D1, via induction du facteur c-MYC, qui par ailleurs favorise l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  (Watson et al. 1991; Oster et al. 2002; Doisneau-Sixou et al. 2003; Casimiro et al. 2013). De plus, les E2 sont capables de réprimer des protéines impliquées dans l'inhibition du cycle cellulaire telles que p21 ou encore p27 (Lai et al. 2001; Foster et al. 2003).

Le rôle étiologique des œstrogènes dans l'apparition des cancers hormono-dépendants, qu'ils touchent la glande mammaire, l'endomètre ou encore l'ovaire, est donc prépondérant. Prenons le cas d'une femme qui a des règles précoces, une ménopause tardive et qui présente des taux naturellement élevés d'œstrogènes. Elle possède de fait une susceptibilité accrue à développer un cancer du sein car le nombre de divisions permettant le renouvellement des cellules épithéliales est important. Cela engendre un risque élevé d'introduire des mutations liées à la réplication de l'ADN mais également un risque que les divisions cellulaires, souvent asymétriques, ne se passent pas correctement. De plus, il est désormais admis que des métabolites issus du catabolisme des œstrogènes, tels que 16 $\alpha$ -hydroxyestrone ou le 4-hydroxyestrone peuvent être carcinogènes par formation d'adduits à l'ADN ou en se liant de manière covalente à des protéines (Yager and Liehr 1996; Germain 2011). Tous ces effets, associés aux facteurs de risques précédemment présentés, contribuent au développement d'une tumeur dite hormono-sensible présentant un nombre plus ou moins élevé de cellules exprimant ER $\alpha$ .



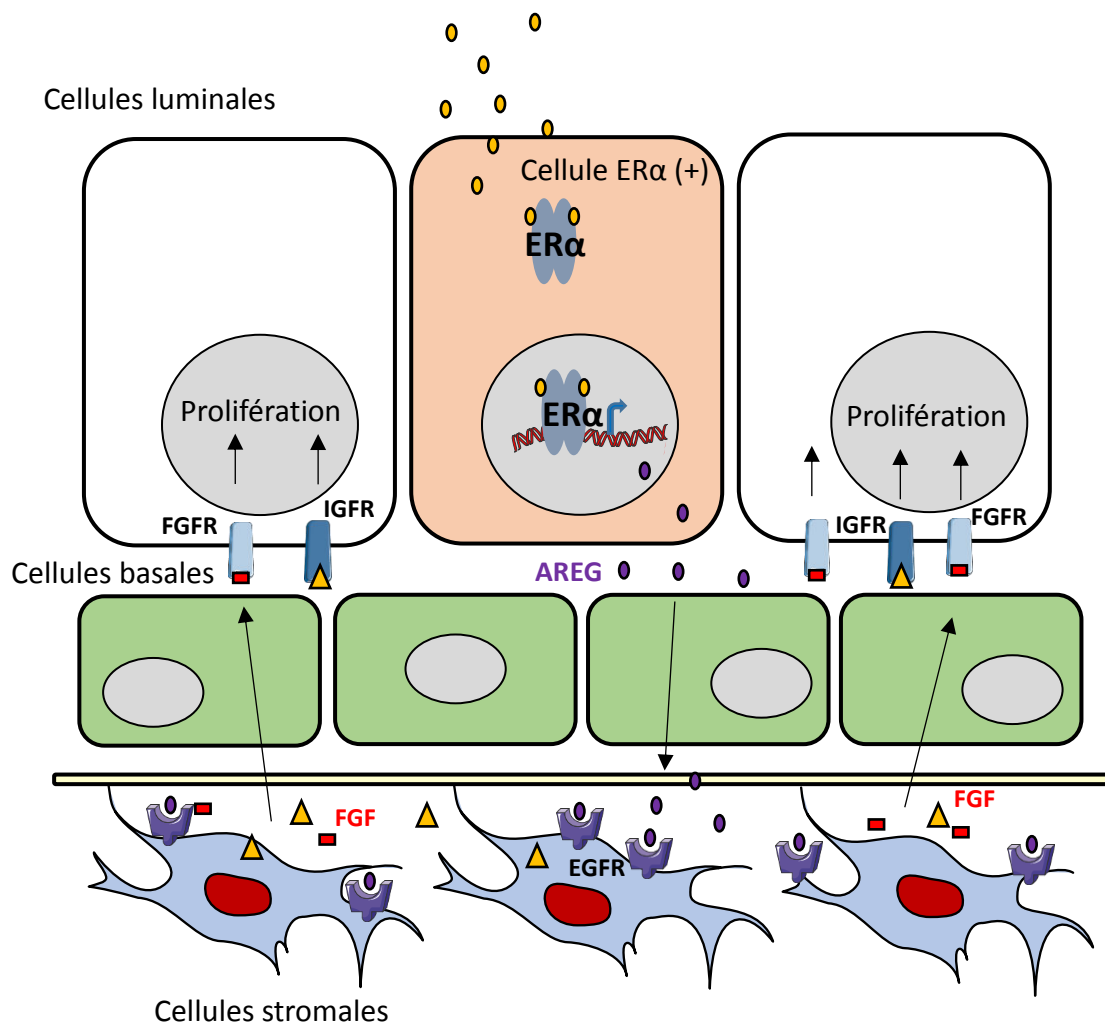


Figure 19 : Modèle d'activation paracrine de la prolifération des cellules luminales par l'amphiréguline induite par l'E2.

Les œstrogènes sont captés par les cellules qui expriment ER $\alpha$  et provoquent l'activation du récepteur, qui va induire l'expression de ses gènes cibles dont l'amphiréguline (AREG). L'AREG est libérée dans le milieu extracellulaire, est activée par des protéases (ADAM17...) puis va se fixer sur les EGFR localisés à la surface des cellules stromales. En réponse à une stimulation par l'AREG, les cellules stromales libèrent en retour des facteurs tels que des FGF « fibroblast growth factor » (FGF2, FGF7...), des IGF « insulin-like growth factor » (IGF1...) qui vont induire la prolifération des cellules épithéliales luminales n'exprimant pas ER $\alpha$ . (Utilisation d'items de Servier Medical Art). D'après Tanos et al. 2012.

## 6. Rôle de l'E2 dans la survie cellulaire

L'effet mitogène des E2 s'accompagne d'un autre effet qui participe à la malignité tumorale : l'effet protecteur contre l'apoptose. En effet, plusieurs études ont démontré que les œstrogènes via ER $\alpha$  en coopération avec Sp1 induisent l'expression de gènes anti-apoptiques de la famille Bcl2, tels que BCL-2, MCL1... (Kanczuga-Koda et al. 2010; Schacter et al. 2014). De plus, il a été démontré que l'E2 pouvait inhiber l'activité de caspases (Gregoraszczyk and Ptak 2011), induire l'expression de la survivine (Yu et al. 2012) ou bien encore en synergie avec l'IGF inhiber le facteur anti-apoptique PAR-4 associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Casolari et al. 2011). L'utilisation de l'hormonothérapie suppressive et compétitrice permet de contrecarrer ces effets anti-apoptotiques, contre lesquels des molécules ciblant notamment les membres de la famille BCL-2 sont actuellement en phase d'essai clinique (Opferman 2016).

## 7. ER $\alpha$ : Rôle dans l'EMT & dans les processus de migration/invasion

Cliniquement la présence d'ER $\alpha$  au sein des tumeurs mammaires constitue un pronostic favorable, d'une part car il permet le recours à l'hormonothérapie et d'autre part parce que sa présence est un frein à l'apparition de métastases (Voutsadakis 2016). ER $\alpha$  est un marqueur typique de différenciation, par exemple en favorisant l'expression de l'E-cadhérine par répression du facteur SLUG (Ye et al. 2010), le KO d'ER $\alpha$  en cellules MCF7 induisant une perte des jonctions intercellulaires (Bouris et al. 2015). De plus, ER $\alpha$  réprime l'enclenchement de l'EMT en inhibant des voies de signalisation impliquées dans la transduction d'un signal pro-EMT, tels que la voie TGF $\beta$ , en adressant les facteurs SMAD2/3 au protéasome (Ito et al. 2010), ou encore en induisant la voie NF $\kappa$ B (Radisky and Bissell 2007). On pourrait également citer la régulation positive de la protéine MTA3 et du facteur REL-B inhibant respectivement les facteurs SNAIL et l'activation des facteurs mésenchymateux tels que la vimentine (Mishra et al. 2004; Wang et al. 2007). Toutes ces études corroborent les travaux montrant que l'activité d'ER $\alpha$  en absence de ligand est un frein à la migration cellulaire, et ce même sur des modèles cellulaires de type MDA-MB-231 (ER $\alpha$  négatif) dans lequel le récepteur a été réintroduit de manière ectopique (Rocheffort et al. 1998; Platet et al. 2000). Par ailleurs, l'expression ectopique d'ER $\alpha$  en cellules MDA-MB-231 réduit fortement leur capacité à donner des métastases, éventuellement par l'inhibition de l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 et du récepteur TNFR11A « Tumor Necrosis Factor Receptor 11A » (Bandyopadhyay et al. 2007). ER $\beta$  possède également une activité suppressive de

l'EMT en inhibant la voie du TGF $\beta$  et en favorisant l'expression de l'E-cadhérine (Reese et al. 2014; Zhou et al. 2015).

Il existe une grande variété de mécanismes par lesquels ER $\alpha$  réprime l'EMT, d'où la difficulté d'être exhaustif, mais de plus en plus d'études commencent à souligner un rôle cette fois-ci inverse, notamment dans le processus de dissémination métastatique. En effet, une hyperactivité non-génomique d'ER $\alpha$  avec l'oncogène c-SRC favorise massivement le développement de métastases osseuses dans un modèle souris (Chiu et al. 2017). L'association ER $\alpha$ /c-SRC, de même que l'association ER $\alpha$ /PI3K ont également été corrélées de manière significative *in vivo* par la technique de PLA « Proximity Ligation assay », à une augmentation du taux de rechutes chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire ER $\alpha$  positives (Poulard et al. 2012). Par ailleurs, il a été montré que dans ces cellules HCC38 n'exprimant pas l'isoforme de 66 kDa mais exprimant l'isoforme de 36 kDa, l'E2 pouvait induire une activation rapide de la kinase PKC, ce qui via ER $\alpha$  36 aboutit à l'expression de gènes tels que SNAIL, RANKL ou encore CXCR4, impliqués dans les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire (Chaudhri et al. 2014).

Malgré son rôle différenciant et inhibiteur de l'EMT, la présence d'ER $\alpha$  n'empêche pas pour autant la dissémination. En effet, on retrouve des métastases exprimant ER $\alpha$ , par ailleurs fréquemment muté sur la tyrosine 537 (cf paragraphe 7.1) (Ross-Innes et al. 2012). Ces métastases ER $\alpha$  (+) sont traitées par hormonothérapie et chimiothérapie avec plus ou moins de succès, c'est pourquoi il y a urgence dans le développement de nouvelles thérapies ciblées (Iwase and Yamamoto 2015).

## **VII. Mécanismes d'échappement au contrôle hormonal et résistance endocrine**

Malgré le bénéfice substantiel des thérapies hormonales, les cas de résistance endocrine, au tamoxifène notamment, sont légion (40 à 50% des tumeurs concernées) et mettent en jeu des mécanismes et des origines extrêmement variés. Dans la grande majorité des cas, les cellules cancéreuses mammaires résistantes continuent d'exprimer ER $\alpha$  (>80%), ce qui corrobore plutôt l'hypothèse d'une modulation de son activité que celle d'une extinction (Jeselsohn et al. 2014). La perte de l'expression du récepteur est bien souvent associée à une méthylation de l'ADN du promoteur de son gène ou à une perte de l'expression de facteurs contribuant à son expression, tels que GATA3 ou FOXM1 (Widschwendter et al. 2004; Madureira et al. 2006; Lee et al. 2014).

Les résistances hormonales ont de nombreuses origines et demeurent encore peu comprises pour bon nombre d'entre elles. Par ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'effet d'une composante micro-environnementale de la tumeur, l'hypoxie, ainsi qu'à l'activité d'une voie de signalisation, la voie Rho/actine/MKL1 dans l'élaboration de résistances endocrines. Avant d'introduire ces deux voies, une présentation des divers mécanismes de résistances hormonales est proposée ci-dessous.

## 1. Mutations d'ER $\alpha$

En altérant sa conformation 3D, ou bien en augmentant son interaction avec des co-activateurs, les mutations ponctuelles du gène *ESR1* contribuent à activer de manière ligand-indépendante le récepteur, ce qui participe de l'étiologie des résistances endocrines (Thomas and Gustafsson 2015). Les multiples méta-analyses des données de séquençage de tumeurs mammaire ont permis d'une part de montrer que beaucoup de tumeurs ER $\alpha$  (+) présentent des mutations du gène *ESR1* et d'autre part que certaines mutations se retrouvent à des fréquences particulièrement élevées. Parmi ces mutations, on retrouve la substitution de la tyrosine Tyr537 en sérine ou en alanine, qui est la plus fréquente, mais également des mutations sur l'Asp538, la Leu536 ou encore la Cys463. Cette mutation (Tyr537) imposerait un repliement particulier favorisant l'interaction du récepteur avec ses co-activateurs, ce qui favoriserait son activité génomique en absence de ligand et donc l'apparition d'une résistance endocrine (Weis et al. 1996; White et al. 1997; Zhang et al. 1997). Par ailleurs, plusieurs études ont retrouvé cette mutation dans des métastases exprimant ER $\alpha$ , de même que sur l'acide aspartique 538 (Robinson et al. 2013; Toy et al. 2013). Ces auteurs émettent l'hypothèse que cette mutation confère un avantage sélectif en favorisant fortement la croissance ligand-indépendante de ces tumeurs, une fois réimplantées dans un organe distant (os ou foie par exemple). Pour la grande majorité, ces mutations sont localisées dans le LDB et favorisent vraisemblablement l'activation d'ER $\alpha$  en absence d'hormone (Thomas and Gustafsson 2015).

Enfin, une autre altération génomique potentiellement importante concerne l'amplification du gène *ESR1*. Plusieurs études contradictoires coexistent dans la littérature, certaines montrant une amplification non négligeable du gène *ESR1* dans les cellules cancéreuses, 5.9% des cas (Ooi et al. 2012), et d'autres dans moins de 1% des cas (Chen et al. 2014). Des corrélations établissant un lien clair entre malignité/résistance hormonale et amplification du gène *ESR1* manquent pour pouvoir incriminer cette altération.

## 2. Variants d'ER $\alpha$

En 2001, Poola et al., ont identifié près d'une vingtaine de transcrits différents, exprimés dans diverses lignées cancéreuses mammaires, codant potentiellement pour différents fragments du récepteur (Poola and Speirs 2001). A cause du manque d'anticorps assez sensibles et spécifiques, très peu de transcrits ont été caractérisés au niveau protéique. Parmi les plus étudiés, on retrouve l'isoforme de 36 kDa (**figure 4**), dépourvue de la fonction AF1 et d'une importante partie de l'AF2. L'expression protéique de ce variant a été corrélée avec une augmentation de la survie cellulaire, de l'invasion et de l'hormono-résistance au tamoxifène, parfois même dans des tumeurs n'exprimant pas l'isoforme de 66 kDa (Lee et al. 2008; Lin et al. 2010; Zhang and Wang 2013; Chaudhri et al. 2014). Une très forte activité non-génomique ligand indépendante de ce variant a par ailleurs été décrite (Chaudhri et al. 2012). En ce qui concerne l'isoforme de 46 kDa (**figure 4**), possédant une fonction AF2 intacte (Flouriot et al. 2000), son expression est plutôt signe de bonne réponse à l'hormonothérapie. En effet, sa perte d'expression a été corrélée à des phénomènes de résistance au tamoxifène et sa surexpression est capable de restaurer la sensibilité à l'E2 (Klinge et al. 2010). Cela a été confirmé cliniquement par une étude menée par Françoise Lenfant, qui montre d'une part qu'environ 75% des tumeurs mammaires ER $\alpha$  66 kDa (+) expriment l'isoforme ER $\alpha$  46 kDa, et d'autre part que plus le grade tumoral augmente, plus l'expression d'ER $\alpha$  46 kDa chute (Chantalat et al. 2016).

## 3. ER $\alpha$ et la voie des facteurs de croissance de l'épiderme

L'interaction de la voie des facteurs de croissance (EGFR, HER2, FGFR, IGF1R) (**figure 20**) et des voies de signalisation PI3K/AKT, MAPK et NF $\kappa$ B avec la signalisation oestrogénique est une source majeure et extrêmement complexe de développement de résistance à l'hormonothérapie. La présence d'ER $\alpha$  cytoplasmique permet d'activer ces voies de signalisation MAPK et PI3K, qui en retour permettent son activation par modifications post-traductionnelles, ce qui favorise la prolifération (Dickson et al. 1986; Nicholson et al. 2007; Garcia-Becerra et al. 2013). La phosphorylation de certains résidus clés tels que les sérines 118 et 167 peut permettre de maintenir une activité transcriptionnelle du récepteur, même en présence de molécules anti-oestrogéniques. Pour corroborer cette assertion, une brillante étude conduite en 2006 a permis de montrer que d'une part, au sein des lignées de cellules MCF7 résistantes au tamoxifène (TamR), ER $\alpha$  est très fortement phosphorylé au niveau de la sérine 118 par la suractivité de l'EGFR/MAPK, et que d'autre part cette suractivité promeut le recrutement des co-activateurs d'ER $\alpha$ , SRC1 et p68 au niveau du promoteur du gène codant

l'amphiréguline, de manière ligand-indépendante. L'utilisation de l'erlotinib, inhibiteur spécifique de l'EGFR, contrecarre cet effet, ce qui souligne le potentiel prometteur des thérapies combinées (Britton et al. 2006). De plus, il a également été montré que l'activité de l'axe HER2/MAPK était également capable d'activer par phosphorylation des co-activateurs d'ER $\alpha$ , tels que SRC3, ce qui participe à la mise en place de résistance au tamoxifène (Font de Mora and Brown 2000; Osborne et al. 2003). D'une manière générale, le tamoxifène tend à avoir une activité agoniste lorsqu'une forte activité des EGFR/MAPK est constatée. C'est exactement ce qu'il se passe lorsque les cellules cancéreuses mammaires restent longtemps privées d'œstrogènes ou lorsqu'elles sont traitées sur de longues périodes avec du tamoxifène (Chan et al. 2002; Santen et al. 2005; Masri et al. 2008).

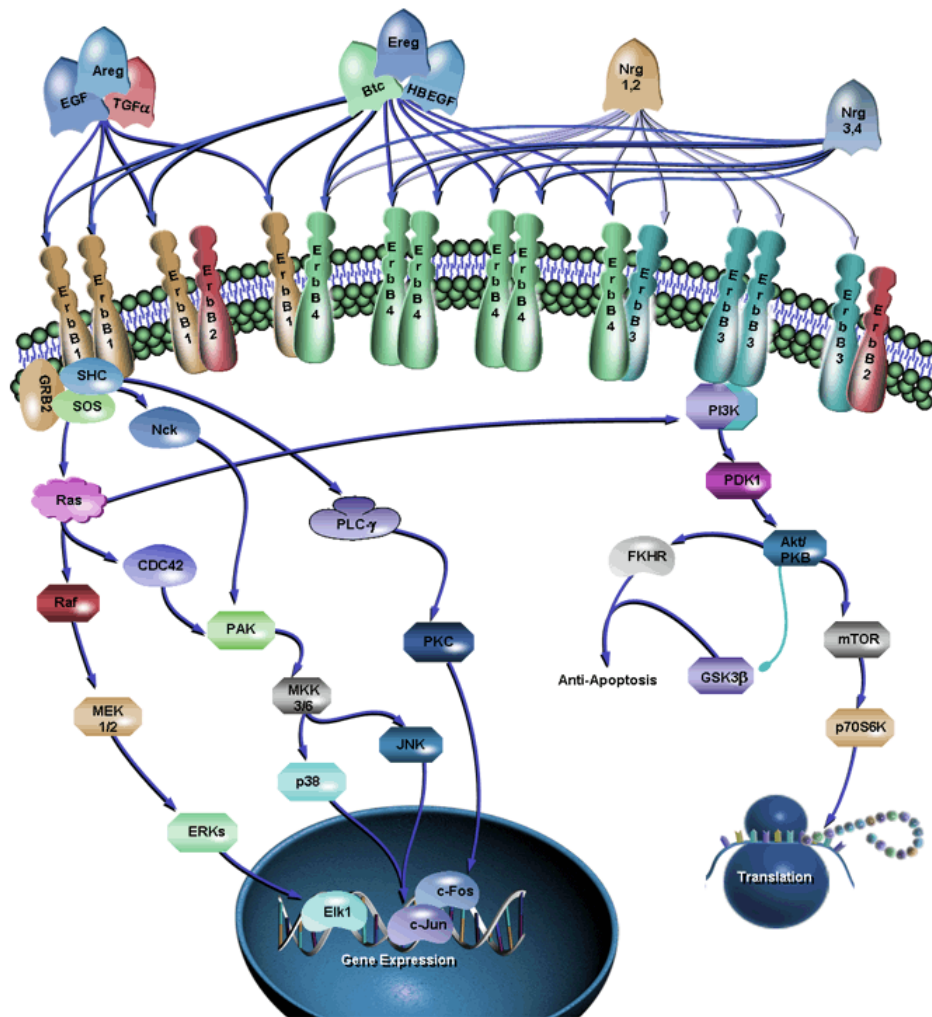


Figure 20: Schéma illustrant la voie des facteurs de croissance épidermiques.

La famille des EGF est composée de 11 ligands : le Transforming Growth Factor ( $TGF\alpha$ ), l'Amphiréguline (AREG), l'Epidermal Growth Factor (EGF), l'Epigen, l'Éréguline (EREG), la BetaCelluline (BTC), l'Héparin Binding EGF (HB-EGF), et les Neurégulines 1 – 4 (NRG1, NRG2, NRG3 & NRG4), et 4 récepteurs EGFR/HER1, HER2, HER3 & HER3. Ces récepteurs peuvent former des homo- ou bien des hétéro-dimères, et possèdent une sélectivité d'interaction avec les ligands de la famille des EGF. Cette voie de signalisation est fréquemment active dans les cas de résistance endocrine. Tiré de SABiosciences.

Par ailleurs, la présence de ligands de la voie des EGF tels que NRG1 ou NRG4 est associée à des phénomènes de résistance et donc à de plus faibles taux de survie alors que d'autres ligands tels que l'epigen sont associés à un meilleur pronostic (McIntyre et al. 2010; Kim et al. 2016). Ces effets opposés de ligands appartenant à la même famille des EGF demeurent peu étudiés et donc peu compris.

Outre leur rôle sur la conformation 3D d'ER $\alpha$ , les récepteurs ERBB1/2 peuvent moduler l'expression protéique d'ER $\alpha$ . Dès 1994, une étude a démontré que la surexpression du récepteur EGFR/ERBB1 mais aussi d'ERBB2/HER2, très fréquemment amplifiés dans les cancers mammaires, s'accompagne d'une chute de l'expression d'ER $\alpha$  (Kern et al. 1994), ce qui contribue à la résistance au tamoxifène (Benz et al. 1992). D'une manière générale, il existe une anti-corrélation nette entre la présence d'ER $\alpha$  et l'activité de la voie des EGFR.

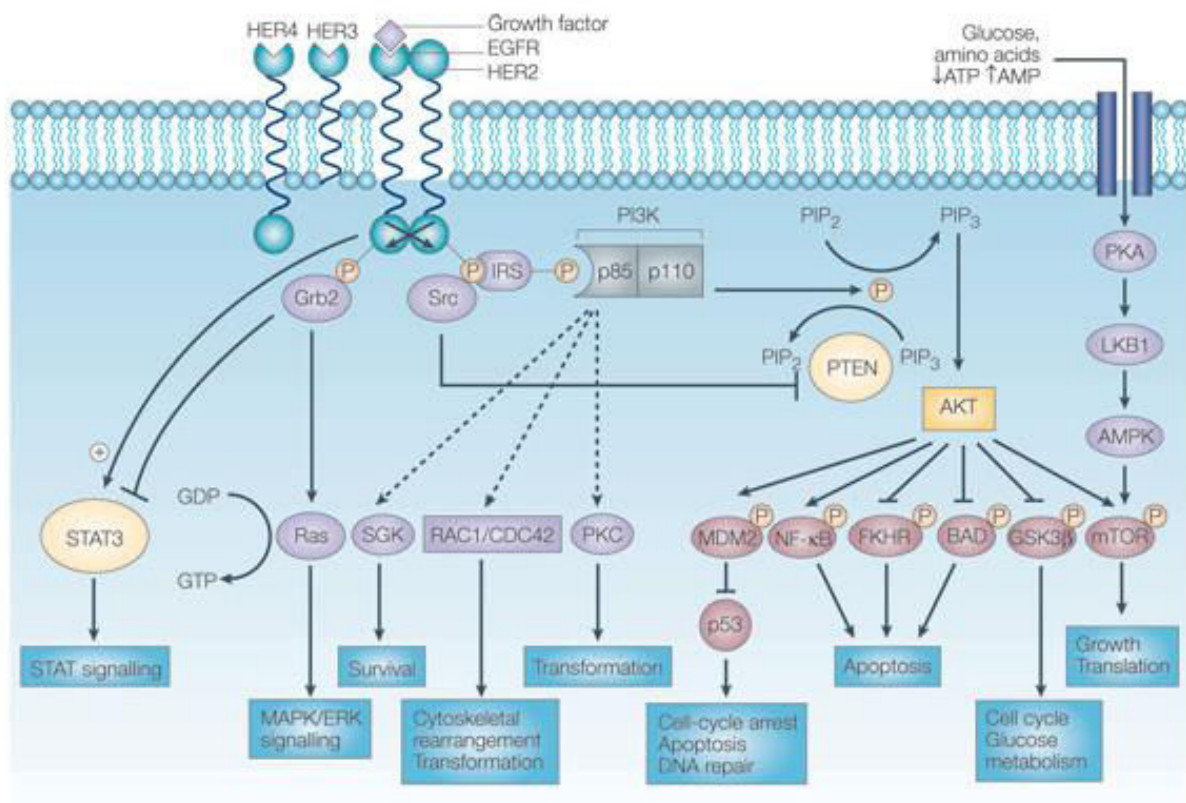
#### 4. Le rôle des IGF dans le processus de résistance

Le tableau se complexifie si l'on intègre la famille des IGF/IGFL. En effet, les IGF sont également capables d'activer de manière indirecte les EGFR, soit par activation de la kinase c-SRC soit par clivage de ligands tels que l'amphiréguline ou l'HB-EGF, ce qui entraîne l'apparition de résistance selon les mécanismes précédemment décrits (Hurbin et al. 2002; Knowlden et al. 2005). Par ailleurs, plusieurs études ont établi une réciprocité entre activation d'ER $\alpha$  et expression du récepteur à l'IGF. L'activation de l'IGF1R par son ligand induit une phosphorylation du récepteur qui en retour augmente son expression (Surmacz 2000). En outre, des cellules MCF7 sur-exprimant ectopiquement l'IGF1R sont hautement résistantes à l'effet antiprolifératif du tamoxifène, qui à faible dose devient même agoniste (Zhang et al. 2011b). L'utilisation de petites molécules inhibitrices de l'IGF1R ou d'anticorps bloquant de l'IGF2 semble prometteuse afin de bloquer la prolifération de cellules cancéreuses résistantes (Fagan et al. 2012).

#### 5. L'importance clinique de la voie PI3K/AKT/mTOR

Sous l'effet de l'E2, la voie PI3K/AKT (**figure 21**) agit en synergie avec la voie de signalisation oestrogénique afin de potentialiser au maximum l'activité du récepteur. Des expériences de co-traitement de cellules MCF7 avec l'E2 et le LY294002, inhibiteur spécifique de la sous-unité p85 de la kinase PI3K, ont démontré une inhibition de l'activité génomique d'ER $\alpha$ , et ce de façon gène-spécifique (Kerdivel et al., en prep). L'activation constitutive de la voie PI3K a été associée à de multiples reprises à la résistance au tamoxifène.





**Figure 21: Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/AKT.**

La voie PI3K/AKT internalise les effets initiés au niveau membranaire par les récepteurs des facteurs de croissance. L'autophosphorylation en trans de ces récepteurs induit leur reconnaissance par la sous unité p85 du complexe kinase PI3K, qui catalyse la conversion des PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub> au niveau sub-membranaire, via sa sous-unité p110. Ces PIP<sub>3</sub> recrutent la kinase PDK1 qui phosphoryle la kinase AKT sur des résidus sérine (473...) et thréonine (308...), permettant son activation. La kinase AKT régule de manière positive ou négative une multitude de facteurs qui interviennent dans l'apoptose (MDM2, bAD...), la croissance cellulaire (mTOR...), la quiescence (FOXOs...), la survie (SGK), le métabolisme glucidique (GSK3...). (PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-3,4-diphosphate; PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). D'après Hennessey et al. 2005

Cela peut se produire consécutivement à une hyperactivité de récepteurs membranaires en amont, tels que l'EGFR/ERBB2/IGFR/FGFR, ou bien encore suite à des mutations de la kinase PI3K ou de la phosphatase PTEN, un régulateur négatif de la kinase AKT. En effet, le KO de PTEN en lignée cellulaire ER $\alpha$  (+) augmente la proportion de AKT phosphorylée. Cela se traduit par une activation ligand indépendante du récepteur, via la phosphorylation de la sérine 167 notamment, et donc par une croissance cellulaire hormono-indépendante (Campbell et al. 2001; Miller et al. 2009; Loi et al. 2010). Les mutations de la kinase PI3K et de la phosphatase PTEN sont estimées à 30% et 10% respectivement dans les cancers ER $\alpha$  (+), ce qui est considérable (Ma et al. 2011).

Face à la forte prévalence de ces mutations, de nombreux essais cliniques d'associations de l'hormonothérapie avec des molécules inhibitrices de cette voie ont été tentés, avec plus ou moins de succès. C'est par exemple le cas de l'essai BOLERO-2 visant à déterminer l'efficacité de l'everolimus, inhibant mTOR1, en association avec l'inhibiteur d'aromatase exemestane. Une réduction significative du volume tumoral a été constatée : 12.6% vs 1.7% exprimé en ORR « Objective Response Rate » (Tryfonidis et al. 2016). Le temsirolimus, autre inhibiteur de la protéine mTOR1, n'a quant à lui pas donné satisfaction en combinaison avec le létrozole (Wolff et al. 2013). Enfin, les résultats dégagés de l'essai clinique BELLE-2 visant à déterminer l'efficacité du buparsilib, un inhibiteur pan PI3K, se sont avérés décevants avec un gain de seulement de 2 mois de PFS « Patient Free Survival » (Baselga et al. 2017). Les résultats issus des différentes études cliniques visant à coupler l'hormonothérapie à l'inhibition de la voie des facteurs de croissance se sont révélés pour lors assez mitigés. L'apparente contribution de ces voies à l'hormono-résistance et la faible efficacité des thérapies combinées, est encore mal comprise. Des phénomènes de redondance entre les différentes voies impliquées participent probablement de façon synergique à la survie tumorale (Clarke et al. 2015).

## 6. La balance des cofacteurs d'ER $\alpha$

Le tamoxifène agit comme un antagoniste dans le cadre du cancer du sein mais se comporte comme un agoniste dans d'autres tissus tels que l'utérus, les os et le système cardiovasculaire. Parmi les hypothèses proposées, celles impliquant une différence d'abondance des cofacteurs sont privilégiées (Smith et al. 1997). Dans une étude conduite par Bert O'Malley, les auteurs montrent que dans un contexte cellulaire ou le 4-OHT exerce une activité agoniste, l'augmentation de l'expression du co-activateur SRC1 favorise la transactivation, alors que le co-répresseur SMRT l'inhibe, en présence de 4-OHT. Dans ce cas précis, l'utilisation du fulvestrant permet d'abolir complètement l'activité agoniste du tamoxifène. En ce qui concerne le co-activateur SRC3, surexprimé dans environ 30% des

cancers, la corrélation avec la mise en place de résistance au tamoxifène et d'activité ligand-indépendante d'ER $\alpha$  a également été constatée et associée à une chute du taux de survie (Anzick et al. 1997; Murphy et al. 2000; Harigopal et al. 2009). Parmi les partenaires d'ER $\alpha$  au niveau chromatinien, la protéine MED1 appartenant au complexe Médiateur, a également été décrite comme pouvant moduler l'efficacité de l'hormonothérapie. Au sein des tumeurs ER $\alpha$  exprimant le récepteur HER2, une hyper-phosphorylation HER2-dépendante de MED1 favorise l'activité ligand indépendante du récepteur. Le KO de MED1 dans ce contexte restaure la sensibilité au tamoxifène de même que l'utilisation de molécules inhibitrices des EGFR, erlotinib et gefitinib (Cui et al. 2012; Zhang et al. 2013). Enfin, le niveau d'expression de co-répresseurs transcriptionnels d'ER $\alpha$  tels que NCor et Tap-2 peuvent également prédire la sensibilité des cellules cancéreuses au 4-OHT (Cutrupi et al. 2012). Dans un modèle de xénogreffe en souris, le développement de tumeurs hormono-résistantes s'accompagne d'une chute de l'expression de NCor, ce qui confirme les observations faites chez des patientes post-ménopause traitées au 4-OHT (Lavinsky et al. 1998; Girault et al. 2003).

## 7. Influence du contexte cellulaire sur le cistrome d'ER $\alpha$

Le fonctionnement d'ER $\alpha$  est très largement influencé par le contexte cellulaire, ce qui dès lors conditionne l'efficacité des thérapies hormonales. Pour nous en convaincre davantage, des travaux publiés par Jason Carroll en 2012 démontrent qu'il existe une certaine plasticité du cistrome d'ER $\alpha$  en fonction du grade tumoral. En effet, certains ERBS du cistrome d'ER $\alpha$  peuvent être redistribués en fonction du pronostic clinique des tumeurs ER (+) mais aussi au sein des métastases exprimant ER $\alpha$  (Ross-Innes et al., 2012). Notamment, les auteurs démontrent un enrichissement *de novo* en sites Pax2 et Ap-1 au sein de lignées tumorales résistantes au tamoxifène. La question de savoir si la redistribution du cistrome participe de la résistance ou n'en est qu'une conséquence, demeure ouverte. Les auteurs proposent que la présence de facteurs sécrétés (IL-6, IGF1, EGF, TNF $\alpha$ ...) interférant avec la signalisation oestrogénique, pourrait être impliquée dans cette redistribution.

## 8. L'hypothèse du « switch » luminal vers basal-like comme facteur de résistance endocrine

La notion de « cell-of-origin » en cancérologie est primordiale, car la tumeur qui en découle est la résultante de l'identité moléculaire de la cellule ancestrale. Cette assertion pourrait ressembler à une lapalissade, mais elle a le mérite de soulever plusieurs questions fondamentales. Intéressons-

nous au cancer du sein : existe-t-il un type unique de cellules (probablement de type souche) capable de donner une tumeur dans le sein, ou bien existe-t-il plusieurs types cellulaires pouvant initier l'apparition d'une tumeur ? Qu'est-ce qui fait qu'une cellule mammaire souche (MaSC), capable de donner des cellules luminales et basales, bascule d'un côté ou de l'autre ? Des cellules au sein d'une tumeur de type luminal peuvent-elle se différencier et acquérir des caractéristiques basales ? Ou bien l'absence de cancer de type basal-like exprimant ER $\alpha$  signifie-t-il qu'il existe des barrières de différenciation que l'on ne peut franchir (**figure 22**) ?

Toutes ces questions demandent des réponses, des explications, qui commencent tout juste à poindre dans la littérature. Une étude a démontré que l'introduction d'une mutation BRCA1 dans des cellules souches dont dérive l'épithélium luminal chez la souris, s'accompagne d'un développement tumoral de type basal-like exclusivement (Molyneux et al. 2010). Cela montre donc que des cancers basal-like peuvent dériver de précurseurs luminaux. Cela a été confirmé par l'étude de Lim et al., montrant que la signature transcriptionnelle des précurseurs luminaux possède beaucoup de traits communs avec la signature des cancers basal-like (Lim et al. 2009), par exemple avec l'expression des cytokératines 5, 6 et 14 (Gusterson et al. 2005). Ces exemples démontrent que des cellules luminales peuvent se trans-différencier au cours du développement tumoral (Prat et al. 2010), ce qui pourrait contribuer à l'apparition de résistance, à l'hormonothérapie notamment (Skibinski et al. 2015).

## 9. ER $\beta$ et son rôle vis-à-vis d'ER $\alpha$ dans le cancer du sein

ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont bien souvent co-exprimés au sein d'un même tissu. De nombreuses études corroborent un rôle inhibiteur d'ER $\beta$  sur l'activité d'ER $\alpha$  en présence d'E2, tant au niveau de la réponse transcriptionnelle que de l'induction de la prolifération des lignées cellulaires MCF7 et T47D (Ström et al. 2004; Williams et al. 2008). Cet effet antiprolifératif est étonnamment retrouvé au sein de cellules triples négatives Hs578T exprimant ectopiquement ER $\beta$  (Dey et al. 2012), probablement par l'expression de protéine inhibant le cycle cellulaire telles p27Kip1 (Hartman et al. 2009). Divers travaux ont mis en évidence que le niveau d'expression d'ER $\beta$  chute à mesure que le développement tumoral s'opère (Roger et al. 2001; Leygue and Murphy 2013), et qu'une forte expression de ce récepteur est associée à une meilleure survie et une bonne réponse à l'hormonothérapie (Myers et al. 2004; Gruvberger-Saal et al. 2007).

## 10. Intégration contextuelle des travaux de thèse

Face à la grande diversité des mécanismes que la tumeur s'est appropriée pour survivre et proliférer, il est difficile d'être d'exhaustif. Par exemple, l'importance des miRNA n'a pas été détaillée dans ce manuscrit alors bien qu'ils aient un rôle capital dans l'élaboration de résistance (García-Becerra et al. 2013). Par ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux facteurs qui contribuent à l'étiologie des résistances endocrines : l'hypoxie, correspondant à une raréfaction de l'oxygène disponible au niveau intra-tumoral, et la voie Rho/MKL1/actine, impliquée dans la dynamique du cytosquelette. La fin de cette introduction sera consacrée à la description détaillée de ces deux voies, et à leurs rôles respectifs dans la modulation de l'activité d'ER $\alpha$ .

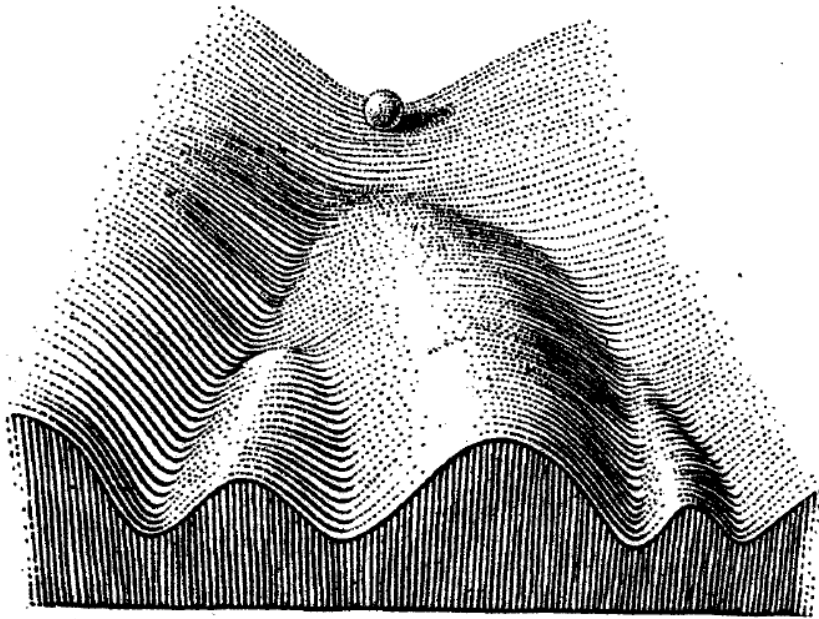


FIGURE 4

*Part of an Epigenetic Landscape.* The path followed by the ball, as it rolls down towards the spectator, corresponds to the developmental history of a particular part of the egg. There is first an alternative, towards the right or the left. Along the former path, a second alternative is offered; along the path to the left, the main channel continues leftwards, but there is an alternative path which, however, can only be reached over a threshold.

Figure 22: Paysage épigénétique de Conrad Hal Waddington.

Cette figure est extraite de l'ouvrage « La stratégie des gènes », publié en 1957. Waddington imaginait la différenciation cellulaire à la manière d'une bille qui dévalait des pentes, chacune de ces pentes représentant un état sur le chemin de la différenciation. Il imaginait que le chemin emprunté par la bille était irréversible, et ce faisant, que l'état cellulaire final que la cellule avait adopté était lui aussi irréversible. Aujourd'hui encore cette représentation prophétique de la différenciation cellulaire demeure d'actualité, notamment au regard des interrogations qui subsistent quant à la présence de cellules souches cancéreuses. Néanmoins depuis les travaux de John Gurdon et de Shinya Yamanaka qui ont abouti au prix Nobel de 2012, l'on sait désormais qu'une cellule peut redevenir souche (donc remonter la pente) grâce à l'expression d'un cocktail de facteurs de transcription (Oct3/4, Sox2, Nanog, Klf4) qui reprogramme la chromatine vers un état indifférencié.

## VIII. Hypoxie et Cancer

### 1. Introduction générale à l'hypoxie

Le microenvironnement tumoral influence le développement de la pathologie et la sensibilité aux divers traitements anticancéreux d'une manière aussi conséquente que complexe. Un des aspects les plus fréquents et les plus étudiés de ce microenvironnement concerne l'hypoxie, terme désignant une raréfaction de l'oxygène disponible au niveau tissulaire. Les cellules de notre corps sont soumises à des concentrations variables d'oxygène selon leur localisation. En effet les cellules de la peau se développent en présence de 20% d'oxygène environ, ce qui correspond à la concentration en O<sub>2</sub> de l'air, alors que les cellules du cerveau s'accommodent de 4,6% d'O<sub>2</sub> en moyenne, celles du rein de 9,5% ou bien encore celles du sein de 8,5% (Muz et al. 2015). Au cours du développement tumoral, la concentration d'oxygène disponible peut atteindre des niveaux extrêmement bas, souvent autour des 1 à 2% et peut même tomber proche de 0% pour les cas extrêmes, on parle alors d'anoxie (**figure 23**). Par ailleurs, on estime que 60% des tumeurs solides présentent des traits hypoxiques. Ce phénomène d'hypoxie intra-tumorale favorise la mise en route d'un processus vital pour le développement de la pathologie : l'angiogénèse. Ce terme, classifié par Robert Weinberg comme une « Hallmark of Cancer », désigne le processus de fabrication *de novo* d'un réseau vasculaire au sein de la tumeur, ce qui favorise sa croissance (Hanahan and Weinberg 2000, 2011). D'ailleurs, un certain nombre d'approches thérapeutiques sont dites anti-angiogéniques car elles visent à inhiber l'action du VEGF « Vascular Endothelial Growth Factor ». La réponse au stress hypoxique est orchestrée par deux principaux facteurs de transcription, HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  pour « Hypoxia Inducible Factor » qui permettent l'expression d'une grande variété de gènes impliqués dans l'angiogénèse donc mais aussi le métabolisme, l'apoptose, le cycle cellulaire ou encore la réponse au stress oxydant (Span and Bussink 2015). La recherche fondamentale portant sur l'hypoxie a été récemment récompensée, grâce aux travaux des pionniers du domaine, Gregg Semenza, Peter Ratcliffe et William Kaelin Jr, tous trois récipiendaires du prestigieux prix Albert Lasker pour la recherche médicale (2016).

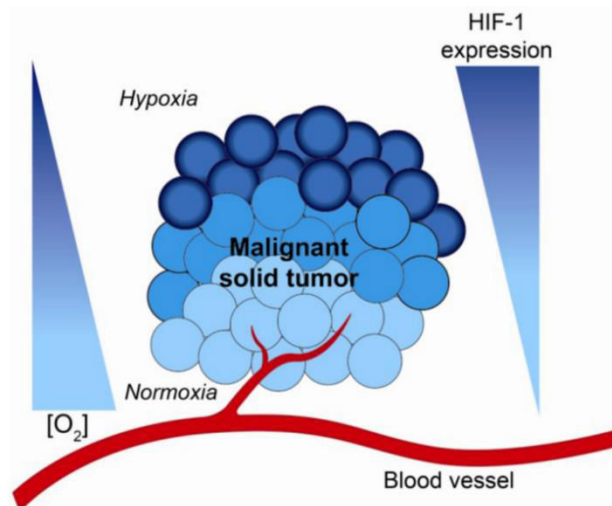


Figure 23: Représentation schématique de l'hypoxie intra-tumorale.

Au cours de la croissance tumorale, des territoires hypoxiques localisés à distance d'un réseau vasculaire peuvent apparaître, favorisant ainsi l'activation des facteurs HIF $\alpha$ . L'hypoxie peut être graduelle, ce qui module l'activation des facteurs HIF $\alpha$  en fonction de la sévérité de la privation en oxygène.



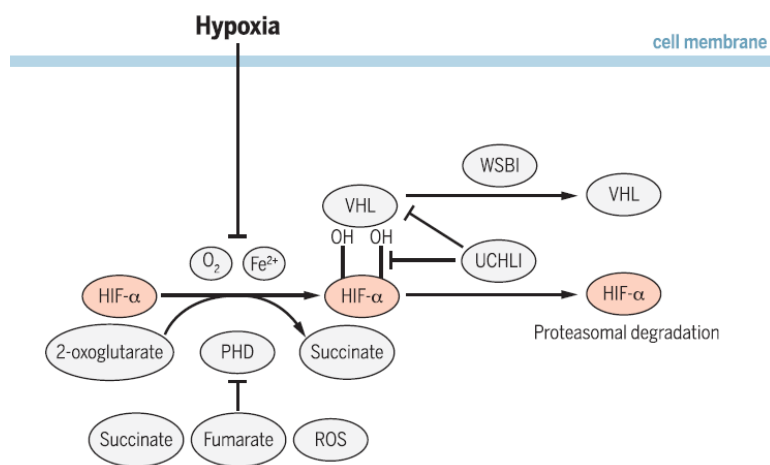
## 2. Oxygène et métabolisme dans le cancer

Nous autres êtres humains, au contraire de certaines bactéries, n'avons pas la capacité de survivre en conditions anaérobiques, ce qui fait de l'oxygène une molécule essentielle à notre survie et à notre métabolisme. Le rôle majeur dévolu à l'oxygène est d'être l'accepteur final des électrons libérés au cours des divers processus cataboliques, notamment dans la chaîne respiratoire. Le processus de production d'énergie à partir d'une molécule de glucose (36 molécules d'ATP) emprunte trois grandes étapes : i) la conversion du glucose en pyruvate, c'est la glycolyse ii) la conversion du pyruvate en acétyl-CoA au cours du cycle de Krebs, iii) et enfin, le transfert des électrons des cofacteurs réduits NADH, NADPH, jusqu'à l'accepteur final O<sub>2</sub> par phosphorylation oxydative. Dans cette complexe chaîne métabolique, l'oxygène n'apparaît qu'à la dernière étape, durant laquelle le cytochrome oxydase catabolise cette célèbre réaction chimique du vivant :  $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$ .

Lorsque la quantité d'oxygène disponible s'amenuise, la production d'ATP par la chaîne respiratoire n'a pas d'autres alternatives que de permuter au profit d'autres voies métaboliques telles que la fermentation lactique qui ne nécessite pas l'oxygène. Ce processus est en revanche bien peu efficace en termes de molécules d'ATP produites : 2 contre 36 par la chaîne respiratoire. Par ailleurs, il y a bien longtemps Otto Warburg avait constaté que les cellules cancéreuses modifiaient profondément leur métabolisme et étaient capables de produire leur ATP par fermentation lactique alors même que l'oxygène était abondant (Otto Warburg et al. 1923; Warburg 1956). Ce « switch » est ainsi nommé « Effet Warburg », d'après son illustre découvreur qui fut nobélisé en 1931. Pour l'anecdote, Warburg eut comme étudiant Hans Krebs, prix Nobel en 1953, pour sa découverte du cycle de l'acide citrique. Avoir recours à la fermentation lactique en présence d'oxygène semble, de prime abord, contre-productif. Mais lorsqu'elles sont en Warburg, les cellules cancéreuses usent de la glycolyse de manière très intense, en augmentant la production des transporteurs de glucose (GLUT) et des enzymes de la glycolyse telles que HK, GAPDH, GLUT1... etc. Une forte activité glycolytique favorise la production de nombreux métabolites intermédiaires parmi lesquels, le glucose-6-phosphate, qui peut s'incorporer dans la voie des pentoses-phosphates. Cette voie synthétise des précurseurs de nucléotides et d'acides aminés, conférant finalement l'avantage aux cellules de proliférer plus intensément (DeBerardinis et al. 2008; Vander Heiden et al. 2009; Semenza 2010b). La voie des pentoses phosphates par le rejet du dioxyde de carbone, ainsi que la fermentation lactique par la production de lactate contribuent à l'acidification typique du milieu intra tumoral. L'hypoxie favorise également le stockage du glucose sous forme de glycogène, en induisant l'expression de la glycogène synthase (Pescador et al. 2010).

### 3. Les facteurs HIF $\alpha$ , les senseurs de l'oxygène à l'échelle cellulaire

L'adaptation cellulaire à l'hypoxie est coordonnée par une famille de régulateurs transcriptionnels HIF « Hypoxia Inducible Factor » identifiés il y a maintenant plus de 25 ans par Gregg Semenza. Le principe d'activation de ces facteurs est rapide et très ingénieux (**figure 24**). En effet, en présence de quantité abondante d'oxygène, les facteurs HIF $\alpha$  (1,2 & 3), localisés au cytoplasme, sont continuellement adressés au protéasome et donc dégradés par l'intermédiaire des protéines PHD « Prolyl Hydroxylase Domain » et FIH-1 « Factor Inhibiting HIF » (Mahon et al. 2001; Kaelin and Ratcliffe 2008). Ces protéines hydroxylent les facteurs HIF $\alpha$  de manière oxygène-dépendante, induisant sa reconnaissance par l'E3 Ligase pVHL « Von-Hippel Lindau » qui catalyse la poly-ubiquitination de HIF- $\alpha$ OH puis son adressage au protéasome (Maxwell et al. 1999). Cela explique pourquoi des mutations de VHL contribuent à l'activation du facteur HIF $\alpha$  alors même que l'oxygène est abondamment disponible. Lorsque l'oxygène se raréfie, l'activité des enzymes hydroxylases diminue, HIF $\alpha$  n'est alors plus hydroxylé donc plus reconnu par VHL et donc plus dégradé. La stabilisation du facteur HIF $\alpha$  s'accompagne de sa translocation nucléaire, ou il se dimérise avec le facteur HIF1 $\beta$ , autrement appelé ARNT et constitutivement exprimé. L'hétérodimère HIF $\alpha$ /HIF1 $\beta$  fixe la chromatine par le biais de HRE « HIF Responsive Element » et coordonne la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie. Chez l'homme, on distingue trois facteurs HIF $\alpha$  (**figure 25**) en plus du cofacteur HIF1 $\beta$ , HIF $\alpha$  1 et 2 (48% d'homologie protéique) orchestrant la vaste majorité des réponses transcriptionnelles à l'hypoxie, et HIF3 $\alpha$  étant très peu étudié. Il existe un panel commun de gènes régulés par les facteurs HIF $\alpha$  1 et 2 mais également des gènes spécifiques à chaque facteur, ces deux facteurs partageant le même élément de réponse : G/ACGTG (<http://hocomoco.autosome.ru/>). Par ailleurs le répertoire de gènes contrôlés par chacun de ces deux facteurs est dépendant du tissu mais également dépendant de la durée du stress hypoxique. En effet, il est généralement admis que lors des 24 premières heures du stress hypoxique, le facteur HIF1 $\alpha$  orchestre la réponse transcriptionnelle alors que celle-ci devient plus majoritairement contrôlée par HIF2 $\alpha$  lorsque la privation d'oxygène dépasse 24 heures. Cette permutation est communément nommée « The HIF switch » (Koh et al. 2011; Koh and Powis 2012). Les deux systèmes ne sont bien sûr pas exclusifs, il s'agit d'une balance de l'activité de chacun de ces deux facteurs, qui est également dépendante de la sévérité du manque d'oxygène (Holmquist-Mengelbier et al. 2006). Une étude a par ailleurs montré qu'une période prolongée d'hypoxie s'accompagne de l'expression d'un petit ARN anti-sens d'HIF1 $\alpha$ , ce qui contribue à l'atténuation de son activité au-delà de 24h (Uchida et al. 2004).



**Figure 24: Schéma illustrant la stabilisation post-traductionnelle des facteurs HIFα en hypoxie.**

En normoxie, les prolyl-hydroxylases (PHD) utilisent l'O<sub>2</sub> comme substrat pour hydroxyler HIFα sur des résidus prolines clés. Cette hydroxylation permet la reconnaissance de HIFα par pVHL, son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, HIFα est stabilisé, il peut alors transloqué dans le noyau où il s'hétérodimérise avec HIF-1 β et exerce son activité transcriptionnelle. Dans les cellules cancéreuses, l'activation de HIF peut aussi résulter d'une augmentation de sa production (TORC1, YB-1) ou bien d'une inhibition de sa dégradation (UCHL1, WBB1). D'après Rankin et Giaccia 2016.

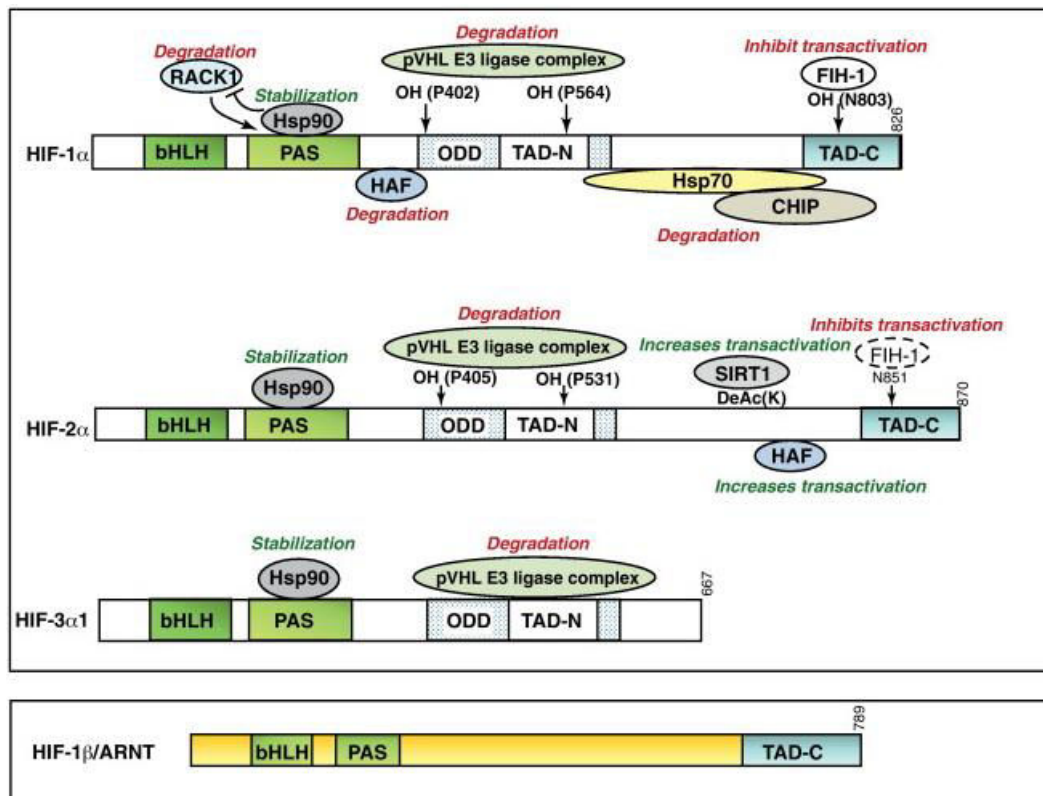


Figure 25 : Domaines structuraux des facteurs HIF-1/2/3  $\alpha$  et de leur partenaire HIF-1 $\beta$ /ARNT (Aryl-Hydrocarbon Nuclear Translocator).

Les domaines basiques hélice-boucle-hélice (bHLH) et Per-Arnt-Sim (PAS) sont impliqués dans la liaison à l'ADN et l'hétérodimérisation; le domaine de dégradation dépendante de l'oxygène (ODD) est requis pour l'hydroxylation et la dégradation dépendantes de l'oxygène; et les domaines de transactivation (N-terminal TAD-N et C-terminal TAD-C) sont requis pour l'activation transcriptionnelle. Les domaines de liaison des modulateurs connus de HIF $\alpha$  sont représentés, ainsi que les effets de ces interactions sur le complexe transcriptionnel HIF (interactions inhibitrices en rouge et activatrices en vert). Le complexe E3 ligase de la protéine von Hippel-Lindau (pVHL) régule la dégradation dépendante de l'oxygène des trois sous-unités HIF $\alpha$ . Le facteur inhibant HIF-1 (FIH-1) hydroxyle HIF-2 $\alpha$  à un rendement plus faible (ovale en trait continu) que HIF-1 $\alpha$  (ovale pointillé). Le récepteur de la protéine kinase C1 activée (RACK1) favorise la dégradation de HIF-1 $\alpha$  lorsque la protéine de choc thermique (Hsp) 90 est inhibée, par exemple par des inhibiteurs de Hsp90. Le facteur associé à l'hypoxie (HAF) se lie sélectivement à HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ , provoquant respectivement la dégradation ou la transactivation. Hsp70 favorise la liaison de CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein) à HIF-1 $\alpha$ , conduisant à la dégradation de HIF-1 $\alpha$ . La sirtuine 1 (SIRT1) désacétyle HIF-2 $\alpha$  ce qui entraîne son activation. D'après Koh et al. 2012

#### 4. Epigénétique & facteurs HIF $\alpha$

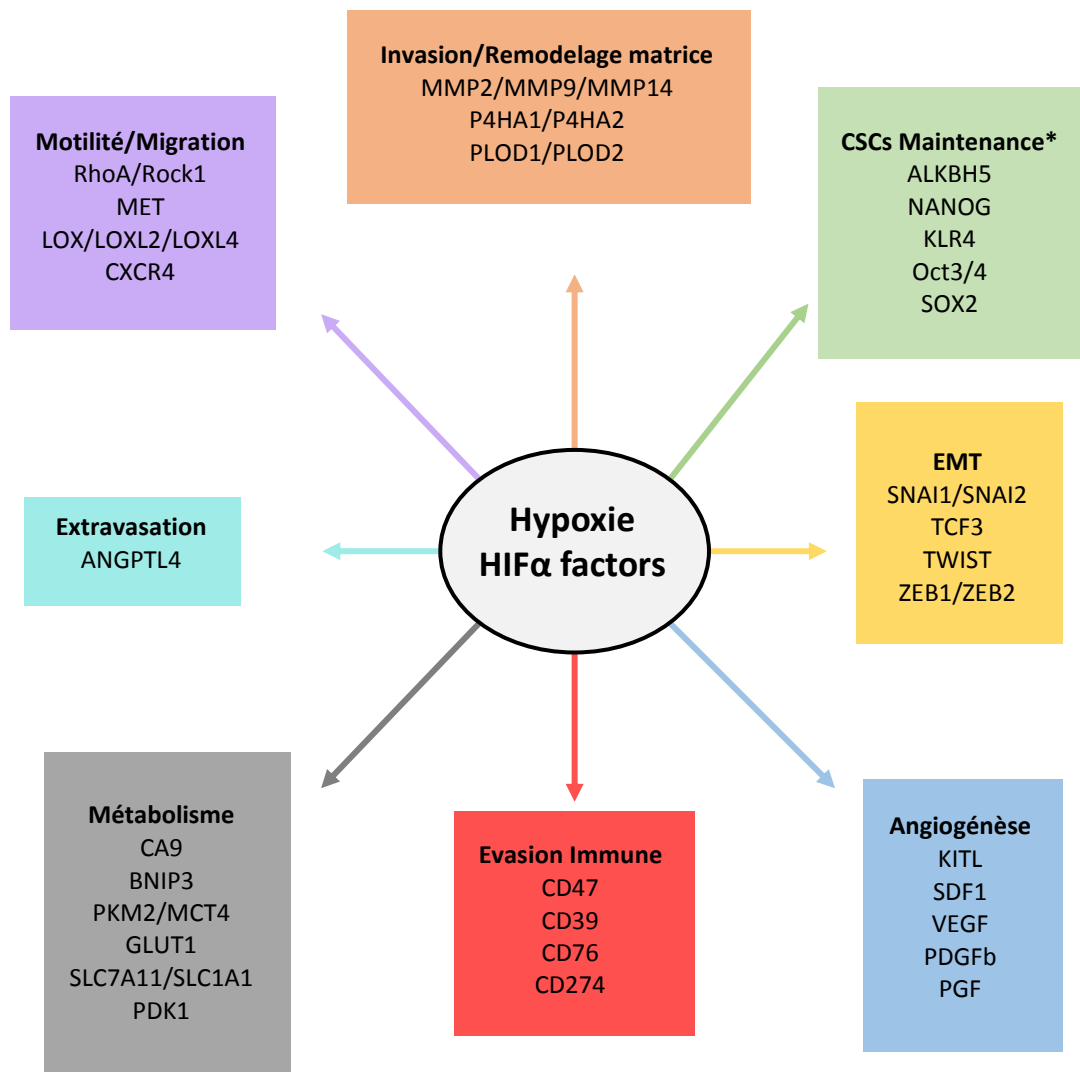
D'une manière générale, l'hypoxie influence la dynamique de la chromatine de façon globale, avec une augmentation de la marque épigénétique H3K4me3 et une diminution de H3K27me3 (Johnson et al. 2008). Les facteurs HIF $\alpha$  sous leur forme hétéro-dimérique complexés à HIF1 $\beta$  exercent leur activité transcriptionnelle en recrutant de façon séquentielle une multitude de complexes enzymatiques, tels que l'acétyl-transférase p300, le complexe ATP-dépendant SWI/SNF ou bien les déméthylases de la famille KDM, qui modifient l'environnement chromatinien à proximité du HRE « HIF Responsive Element » (Kenneth et al. 2009; Tsai and Wu 2014). Selon le tissu considéré, des cofacteurs potentialisent l'activité de transactivation du facteur HIF $\alpha$ , tels que MTA1 par exemple qui augmente l'expression du VEGF dans le modèle MDA-MB-231 (Moon et al. 2006). Des études par CHIP-seq des facteurs HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  ont permis d'associer respectivement 400 et 425 sites de fixation à la chromatine pour chacun de ces deux facteurs, en lignée MCF7 (Schödel et al. 2011). Les auteurs émettent l'hypothèse que la nature des séquences qui flanquent la séquence consensus G/A-CGTG partagée par les deux facteurs HIF $\alpha$  pourrait expliquer la spécificité de liaison. Par une analyse croisée de données cistromiques et transcriptomiques en cellules MCF7, ils montrent qu'environ 20% des gènes sont régulés à la fois par HIF1 $\alpha$  et par HIF2 $\alpha$ , les 80% restant étant régulés de façon spécifique à chaque facteur (Mole et al. 2009). Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont établi le cistrome de HIF1 $\beta$  et ont validé sa présence sur plus de 95% des sites liés par HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ . En revanche, il existe une multitude de sites HIF1 $\beta$  qui ne corrélaient pas avec les facteurs HIF $\alpha$ , ce qui s'explique notamment par le fait que HIF1 $\beta$  agit comme cofacteur d'autres récepteurs nucléaires tels que AhR « Aryl-hydrocarbon Receptor » (Dolwick et al. 1993).

#### 5. L'hypoxie et son rôle dans la progression maligne du cancer

Les analyses immuno-histologiques de biopsies tumorales ont permis d'établir une corrélation claire entre stabilisation des facteurs HIF $\alpha$  et pronostic défavorable de rémission, et ce quel que soit le type de cancer concerné (Semenza 2010a; Deeb et al. 2011; Morine et al. 2011; Zheng et al. 2013). L'hypoxie est un processus cyclique et extrêmement dynamique qui, par l'intermédiaire des facteurs HIF $\alpha$ , régule une grande variété de gènes impliqués dans divers processus contribuant au développement tumoral. Par exemple, le manque d'oxygène enclenche le programme d'angiogenèse afin de restaurer une concentration d'oxygène viable, alors qu'une exposition prolongée à une hypoxie sévère entraîne la mort cellulaire par asphyxie (Schito and Semenza 2016). Outre l'angiogenèse,

l'hypoxie favorise la reprogrammation métabolique, l'invasion, la motilité, l'EMT et le remodelage de la matrice extracellulaire (Semenza 2016) ou bien encore l'enrichissement en cellules souches cancéreuses et l'évasion immunitaire (Noman et al. 2014; Park et al. 2016; Xie et al. 2016). Afin de mieux appréhender la diversité des processus qui concourent au développement malin de la pathologie cancéreuse, un panel représentatif des gènes dont l'expression est contrôlée par les facteurs HIF $\alpha$  est présenté en **figure 26** (Mathieu et al. 2011; Mimeault and Batra 2013; Schito and Semenza 2016).

De plus, il est bien connu que des cellules hypoxiques sont beaucoup plus résistantes à la radiothérapie. En effet, les cassures de l'ADN sont induites par ionisation directe des bases de l'ADN ou bien indirectement par des radicaux oxygénés formés par ionisation des molécules d'eau à proximité de la molécule d'ADN. L'oxygène a tendance à réagir fortement avec les extrémités coupées pour former des composés peroxydes qui sont plus difficilement réparables par la cellule, or en hypoxie l'oxygène étant moins abondant, les coupures sont plus facilement réparées, ce qui contribue à la radiorésistance (Moeller et al. 2007). Les thérapies conventionnelles sont élaborées pour éliminer des cellules correctement oxygénées, il reste par contre beaucoup de progrès à faire pour mettre au point des stratégies efficaces pour détruire des cellules cancéreuses hypoxiques. Par ailleurs, l'hypoxie favorise également l'émergence de résistances à la chimiothérapie à base de cisplatine, de 5 Fluoro-Uracile, de doxorubicine, de paclitaxel ou encore d'étoposide, par des mécanismes extrêmement complexes (Doktorova et al. 2015). L'hypoxie peut favoriser un état cellulaire quiescent qui va rendre moins sensibles les cellules à la chimiothérapie. De plus, l'hypoxie favorise l'expression de la protéine MDR1 « MultiDrug Resistance 1 » appartenant à la super famille des transporteurs ABC, qui est très fréquemment associée à la chimiorésistance dans tous les cancers (Comerford et al. 2002). L'hypoxie peut également favoriser la survie cellulaire par l'expression d'IAP « Inhibitor of Apoptosis », ou bien sur-activant la voie PI3K/AKT (Arsham et al. 2004; Cipro et al. 2012).



**Figure 26 : Hypoxie et développement tumoral malin.**

Ce schéma illustre la diversité des programmes transcriptionnels contrôlés par les facteurs HIF $\alpha$  en hypoxie. Ils favorisent la reprogrammation métabolique, la dissémination et la transformation tumorale. Pour chaque programme, quelques gènes représentatifs contrôlés directement par les facteurs HIF $\alpha$  sont indiqués. Figure réalisée d'après Mimeault et al. 2013; Schito et Semenza, 2016; Mathieu et al., 2011. \*CSC : Cancer Stem Cell (cellule souche cancéreuse).

## 6. Angiogenèse et thérapies anti-angiogéniques

Les tumeurs solides sont initialement dépourvues de système vasculaire, ce qui limite la diffusion de l'oxygène mais également des nutriments au sein de la tumeur. La germination de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants est une réponse adaptative au stress hypoxique, d'autant plus si celui-ci perdure dans le temps. HIF est un régulateur essentiel de l'angiogenèse, notamment car il régule positivement un grand nombre de facteurs indispensables à ce processus. Le plus emblématique est le VEGF pour « Vascular Endothelial Growth factor » (A, B, C, D), mais il y a également la chimiokine SDF1 (CXCL12), les angiopoïétines (ANGPT), le PGF « Placental Growth Factor » ou encore le PDGF « Platelet Derived Growth Factor » (Carmeliet et al. 1998; Du et al. 2008; Rey and Semenza 2010; Schito and Semenza 2016). En se fixant sur leurs récepteurs localisés à la surface des cellules endothéliales, des péricytes et des cellules lisses musculaires, tous ces facteurs sécrétés participent de la synthèse *de novo* de vaisseaux sanguins.

Le processus de vascularisation favorise la croissance tumorale, il a donc été naturellement source de développement thérapeutique visant à l'inhiber. Parmi les molécules utilisées cliniquement on retrouve, le Bevacizumab, un anticorps monoclonal bloquant le VEGF-R, ainsi que des petites molécules telles que le Sorafenib, le Sunitinib et le Pazopanib inhibant le VEGF-R et/ou le PDGF-R. Les thérapies anti-angiogéniques se sont avérées être d'une efficacité redoutable pour faire régresser le volume tumoral, d'autant plus lorsqu'elles sont couplées à des inhibiteurs pan-HIF (Rapisarda and Melillo 2012). Néanmoins, après arrêt de la thérapie, un nombre important de rechutes a été observé, parfois avec un gain de malignité et un développement métastatique de la maladie. Une brillante étude conduite par Agnès Noel au Giga de Liège, a permis de mettre en évidence que sous la pression d'une thérapie anti-angiogénique, les cellules de cancers du sein triples négatives étaient capables d'accumuler des gouttelettes lipidiques, permettant la survie par la  $\beta$ -oxydation comme moyen de production d'énergie. Le couplage de cette thérapie à des molécules inhibitrices d'enzyme de la  $\beta$ -oxydation permettait d'accentuer fortement le gain des thérapies anti-angiogéniques, tout en diminuant les rechutes (Vu en conférence, pas encore publié).

## 7. Les interrelations entre l'hypoxie et les voies de signalisation cellulaire

L'hypoxie est une caractéristique majeure du microenvironnement tumoral parce qu'elle affecte une multitude de voies de signalisation qui peuvent contribuer à la malignité tumorale. L'idée n'est pas d'établir un catalogue fourre-tout de ces interrelations, mais de donner quelques exemples



illustrant comment l'hypoxie use de ces voies pour influencer le développement tumoral. Une attention particulière sera portée à la voie PI3K/AKT.

Une brillante étude a démontré que l'hypoxie provoque l'activation des protéines TET1 et TET3 « Ten Eleven Translocation », ce qui favorise l'expression du TNF $\alpha$  qui active la voie de signalisation p38MAPK afin de maintenir la capacité de cellules mammaires à initier la formation d'une tumeur. On parle alors de TIC « Tumour Initiating Cells » (Wu et al. 2015). Par ailleurs, l'hypoxie favorise l'activation de la voie MAPK qui en retour participe au maintien de l'activité transcriptionnelle du facteur HIF1 $\alpha$  par un jeu complexe de phosphorylations (Ser641 et 643), contribuant à la prolifération tumorale dans certains modèles (Sang et al. 2003; Mylonis et al. 2006).

La voie PI3K/AKT/mTOR joue un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance ainsi que du métabolisme, et est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses. Il existe une réelle controverse sur l'interrelation entre la signalisation hypoxique et la voie PI3K/AKT. En effet, selon certaines études, les cellules captent très rapidement, en quelques minutes, l'appauvrissement en oxygène, et y répondent par une activation de la kinase AKT, ce qui participe ensuite à la stabilisation du facteur HIF1 $\alpha$  (Joshi et al. 2014). Par ailleurs, il a été démontré que la mutation du suppresseur de tumeur PTEN, enzyme qui déphosphoryle les PIP3 membranaires en PIP2 pour inhiber la voie PI3K, favorise l'activité de HIF1 $\alpha$  (Zundel et al. 2000). De plus, il a été montré dans un modèle de cellules HNSCC « Head and Neck Squamous Cell Carcinoma », que l'activation d'AKT (pSer473) prolongée dans le temps après un stress hypoxique contribue à la survie cellulaire. Un traitement avec le MK2206, inhibiteur spécifique d'AKT, permet d'abolir cet effet protecteur (Stegeman et al. 2012). Néanmoins, un mode d'action complètement opposé coexiste dans la littérature, affirmant que la voie PI3K/AKT n'est pas indispensable à l'activation du facteur HIF1 $\alpha$  (Alvarez-Tejado et al. 2002; Arsham et al. 2002), et que d'une hypoxie prolongée résulte une inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR, par plusieurs mécanismes. Soit par la sécrétion d'IGFBP (IGFBP3) (Feng et al. 2016), ou bien par activation de l'enzyme REDD1/DDIT4, qui inhibe la signalisation via mTOR (Di Conza et al. 2017). Cette inhibition permettrait d'induire un état de dormance, notamment par l'activation des facteurs FOXO afin de survivre sous pression hypoxique (Bakker et al. 2007; Hoppe-Seyler et al. 2017). La discordance des études dans la littérature peut s'expliquer de plusieurs manières. En effet, le profil d'activation d'AKT peut être transitoire, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains auteurs observent une phosphorylation d'AKT alors que d'autres non, si le temps après induction du stress hypoxique n'est pas le même. Par ailleurs l'inhibition de la voie PI3K peut se faire à différents niveaux dans la cascade de signalisation, soit par AKT, par mTOR ou encore plus en aval via p70S6K, ce qui n'induit par les mêmes réponses adaptatives (Porta et al. 2014). Le degré de différenciation

cellulaire est également un paramètre indispensable à prendre en compte. On sait par exemple que des cellules à caractère souche s'adaptent extrêmement bien à l'hypoxie, et prolifèrent parfois même plus intensément qu'en normoxie (Lau et al. 2017), alors que des cellules différenciées ont tendance à développer un état quiescent (Mottet et al. 2003; Fluegen et al. 2017). Pour l'anecdote, une équipe de l'institut Pasteur a observé que des cellules de type souche de l'organisme humain pouvaient survivre jusqu'à 17 jours post mortem car elles résistent très bien à l'hypoxie (Latil et al. 2012).

## **8. Méthodes expérimentales pour générer de l'hypoxie.**

Outre les chambres hypoxiques utilisées par les sportifs de haut niveau pour faire grimper leur taux d'EPO, il est possible de générer un environnement cellulaire hypoxique de maintes façons. La plus physiologique consiste en l'utilisation d'une station hypoxique (Perkin Elmer ou Don Whitley), capable de réguler de manière très fine le pourcentage d'oxygène, de dioxyde carbone et de diazote, tout en offrant la capacité de manipuler les cellules sans les ré-oxygéner par le biais de trappes hermétiques. Il existe également des petites chambres que l'on peut placer dans un incubateur classique, dans lesquelles l'oxygène est chassé afin de créer une atmosphère hypoxique. Enfin, pour ce qui est de l'hypoxie gazeuse, il existe un système qui utilise la chélation de l'oxygène par l'acide ascorbique dans une chambre hermétique, cela permet de générer une atmosphère avec < 1% O<sub>2</sub>. L'alternative à l'hypoxie gazeuse repose sur l'utilisation d'agents mimétiques chimiques de l'hypoxie, tels que le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) qui inhibe les hydroxylases, ce qui induit l'activation des facteurs HIF $\alpha$ . Il existe également, le diméthylaloxaloylglycine (DMOG), un autre inhibiteur des hydroxylases, la desférrioxamine (DFO), un chélateur d'ions fer qui stabilise HIF $\alpha$  par la voie Cox2 ou bien encore la roténone et le cyanure (ion CN<sup>-</sup>) qui sont des inhibiteurs de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie.

## **IX. L'hypoxie comme facteur de résistance endocrine dans les cancers ER $\alpha$ (+)**

### **1. Inhibition transcriptionnelle du gène *ESR1* et dégradation d'ER $\alpha$ par l'hypoxie**

La diversité des programmes transcriptionnels contrôlés par le facteur HIF $\alpha$  contribue de manière considérable au développement tumoral, quel que soit l'organe atteint. Mais l'hypoxie peut également avoir un impact ciblé sur le développement de la pathologie, par exemple en modulant

l'activité et l'expression de récepteurs nucléaires. En effet, dans le cas du cancer de la prostate, l'hypoxie potentialise l'activité du récepteur aux androgènes, ce qui contribue à la résistance aux traitements anti-androgéniques (Park et al. 2006). Pour ce qui est du cancer du sein, la présence de territoires hypoxiques est signe de mauvais pronostic en termes de survie et de réponse à l'hormonothérapie. L'étude des interrelations hypoxie et sensibilité hormonale dans le cadre des cancers du sein ER $\alpha$  (+) remonte aux années 2000. Plusieurs études concises ont montré que l'hypoxie induit une perte d'expression d'ER $\alpha$ , sur lignée cellulaire (Kurebayashi et al. 2001; Stoner 2002; Cho et al. 2005; Park et al. 2009; Yi et al. 2009) mais également sur coupes histologiques provenant de tumeurs mammaires ER $\alpha$  (+), dans lesquelles une corrélation claire entre activation du facteur HIF1 $\alpha$  et disparition d'ER $\alpha$  a été établie (Generalì et al. 2009). Par ailleurs, il a été démontré que la perte d'expression d'ER $\alpha$  pouvait s'opérer à deux niveaux : d'une part par une dégradation protéique dépendante du protéasome (Cooper et al. 2004), et d'autre part par le biais d'une répression transcriptionnelle HIF1 $\alpha$ -dépendante de l'expression du gène *ESR1* (Ryu et al. 2011). Néanmoins, l'inhibition transcriptionnelle du gène *ESR1* demeure plus sujette à controverse car une étude publiée récemment contredit cet effet et démontre que dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires, la production d'ARNm du gène *ESR1* demeure inchangée sous pression hypoxique (Padró et al. 2017). Par ailleurs, le « cross-talk » HIF $\alpha$ /ER $\alpha$  ne se limite pas à l'hypoxie, mais s'opère également dans une situation normoxique. En effet, des travaux ont montré que le KO de HIF2 $\alpha$  en cellules cancéreuses mammaires provoque une augmentation de l'expression d'ER $\alpha$  (Higashimura et al. 2016). Le KO de l'E3 ligase du facteur HIF $\alpha$ , VHL, permet tout aussi bien d'augmenter l'expression d'ER $\alpha$  dans le tissu mammaire. Ceci a été confirmé dans les carcinomes rénaux mutés pour VHL, dans lesquels une restauration de l'expression d'ER $\alpha$  est observée (Jung et al. 2012). Par ailleurs, il existe une réciprocité de l'interaction ER $\alpha$ /HIF2 $\alpha$ , selon une étude montrant une absence d'expression de HIF2 $\alpha$  dans des tumeurs ER $\alpha$  (+) spécifiquement. Les auteurs avancent l'hypothèse d'une répression transcriptionnelle du gène codant HIF2 $\alpha$  par le biais d'un ERE situé à proximité du gène (Fuady et al. 2016).

## 2. Effets de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$

Les conséquences de l'hypoxie sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  demeurent plus sujettes à controverses. En effet, même si la majorité des études tendent à montrer que l'hypoxie inhibe l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  après stimulation par l'E2, ce qui s'accompagne d'une inhibition de son effet mitogène en cellules cancéreuses mammaires (Kurebayashi et al. 2001; Padró et al. 2017), certaines montrent l'inverse par le biais d'expériences de gènes rapporteurs ERE-luciférase. Il a même

été publié que l'hypoxie induisait une activité ligand-indépendante du récepteur en cellules rénales HEK293 (Cho et al. 2006). L'analyse transcriptomique et cistromique permettant de décortiquer finement l'activité d'ER $\alpha$  sous pression hypoxique est donc nécessaire.

### 3. Hypoxie et résistance hormonale

La modulation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  par l'hypoxie est naturellement source de développement de résistances hormonales. Outre l'inhibition de l'expression du récepteur et de son activité génomique par les facteurs HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ , l'hypoxie induit des effets plus globaux sur l'apparition de résistance. En effet, des expériences de xéno greffes de cellules MCF7 stablement transfectées par le facteur HIF1 $\alpha$  montrent qu'elles développent un mode de prolifération qui shunte l'effet de l'ICI 182 780 et du tamoxifène, mais qui demeure sensible à l'utilisation de l'acide zolédronique, inhibiteur du facteur HIF1 $\alpha$  (Jia et al. 2015; Yang et al. 2015). Par ailleurs il a été montré que l'activation du facteur HIF2 $\alpha$  en lignées cancéreuses mammaires sur des périodes prolongées d'hypoxie, s'accompagne d'une régulation positive de l'EGFR/HER1 et de l'amphiréguline. L'hypothèse d'une boucle positive de régulation paracrine de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires sous hypoxie a été proposée comme facteur étiologique de résistance à l'hormonothérapie. L'utilisation de la molécule FM19G11, un inhibiteur pan-HIF $\alpha$  s'est avéré efficace pour endiguer l'effet de cet axe de prolifération HIF2 $\alpha$ /EGFR/AREG et restaurer la sensibilité aux molécules anti-oestrogéniques (Stiehl et al. 2011; Alam et al. 2016).

## X. La voie RhoA/MKL1/Actine

### 1. Introduction générale

Le facteur SRF « Serum Response Factor » est un facteur de transcription majeur qui contrôle la dynamique du cytosquelette de l'actine, mais également la prolifération et la différenciation des cellules musculaires (Arsenian et al. 1998; Olson and Nordheim 2010). Le facteur SRF fonctionne très majoritairement en partenariat avec deux familles de co-activateurs : les membres de la famille TCF « Ternary Complex Factor » (ex : SAP1, ELK1, NET), et avec les myocardines et les MRTF « Myocardin Related Transcription Factor » (MRTFa et MRTFb). C'est l'association du facteur SRF avec ses partenaires qui va dicter son activité au niveau de la chromatine et donc le type de gènes cibles qu'il

va réguler. L'activité du facteur SRF est notamment régulée par des GTPases de la famille Rho, telle que la protéine RhoA « Ras homolog gene family, member A », localisée dans le cytoplasme (Hill et al. 1995). L'activation de la GTPase RhoA peut s'opérer de différentes manières (**figure 27**). En effet, elle peut s'effectuer en réponse à la rupture des jonctions cellulaires E-Cadhérine par des protéases extracellulaires, à la présence de ligands de la famille des facteurs de croissance (HB-EGF...) ou encore à la présence de signaux provenant de la matrice extracellulaire (Angiotensin II...) (Bregeon et al. 2009; Micalizzi et al. 2010; Tong et al. 2016). Ces divers signaux induisent l'activation de récepteurs membranaires tels que des récepteurs tyrosine kinase (RTK) ou encore des récepteurs couplés aux protéines G (RCGP) qui vont induire l'activation de la GTPase RhoA. Sous sa forme active, la protéine RhoA-GTP induit l'activation par phosphorylation de diverses protéines en aval, comme la sérine/thréonine ROCK1 « Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1 », ce qui va permettre de catalyser la polymérisation d'actine globulaire (actine G) en actine filamenteuse (actine F) (Sotiropoulos et al. 1999; Copeland and Treisman 2002; Bhadriraju et al. 2007). L'implication du facteur MKL1 arrive en aval de l'activation de la polymérisation et permet d'intégrer les déformations du cytosquelette au niveau génomique. En effet, dans des cellules épithéliales quiescentes, MKL1 par ses multiples motifs RPEL (**figure 29**), est majoritairement séquestré par les monomères d'actine G dans le cytoplasme, ce qui bloque sa translocation nucléaire. A l'inverse, en présence de signaux induisant un remodelage dynamique du cytosquelette d'actine, l'activation de la GTPase RhoA induit la polymérisation d'actine, ce qui libère MKL1 de la séquestration. MKL1 adopte une nouvelle conformation 3D, ce qui rend fonctionnels ses NLS et permet son transit jusqu'au noyau (Posern et al. 2002; Vartiainen et al. 2007). La polymérisation en actine F potentialise donc l'activité du facteur SRF, en permettant l'accumulation nucléaire de son co-activateur MKL1, qui va coordonner l'expression de gènes cibles tels que l'actine, l'actine de muscle lisse ( $\alpha$ SMA), la vimentine... (Miralles et al. 2003; Settleman 2003; Baarlink et al. 2013).

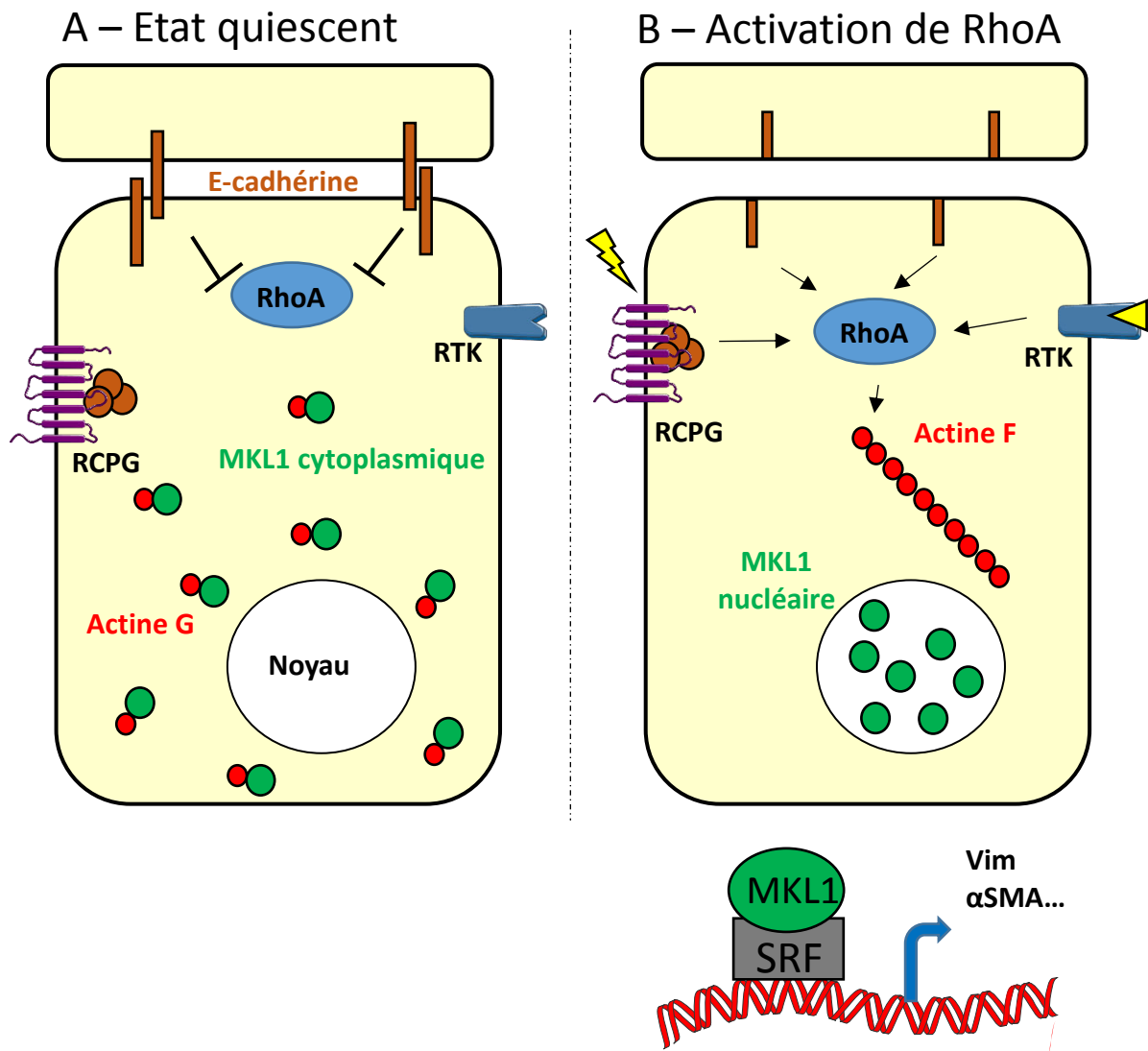


Figure 27: Schéma représentant l'activation de la voie RhoA-MKL1.

(A) Dans une cellule épithéliale différenciée, la présence de jonction cellulaire comme l'E-cadhérine est un frein à l'activation du facteur RhoA. La protéine MKL1 cytoplasmique est séquestrée par les monomères d'actine globulaire (actine G) qui interagissent avec ses motifs RPEL. (B) L'activation de la voie RhoA peut s'opérer de diverses façons : i) par rupture des jonctions cellulaires, ii) par des ligands de la famille des facteurs de croissance (HB-EGF...), ou encore iii) par des signaux provenant de la matrice extracellulaire (Angiotensin II...). L'activation de la GTPase RhoA provoque la polymérisation d'actine globulaire en actine filamenteuse (actine F), ce qui libère le facteur MKL1. Celui-ci peut alors transloquer au noyau et agir comme coactivateur du facteur SRF (Serum Response Factor) afin de coordonner l'expression d'un panel de gènes cibles impliqués dans la dynamique du cytosquelette tels que l'actine, l'actine de muscle lisse ( $\alpha$ SMA pour « Smooth Muscle Actin »), la vimentine... etc. L'activation de cette voie est notamment associée aux changements morphologiques de la transition épithélio-mésenchymateuse. (Utilisation d'items de Servier Medical Art)

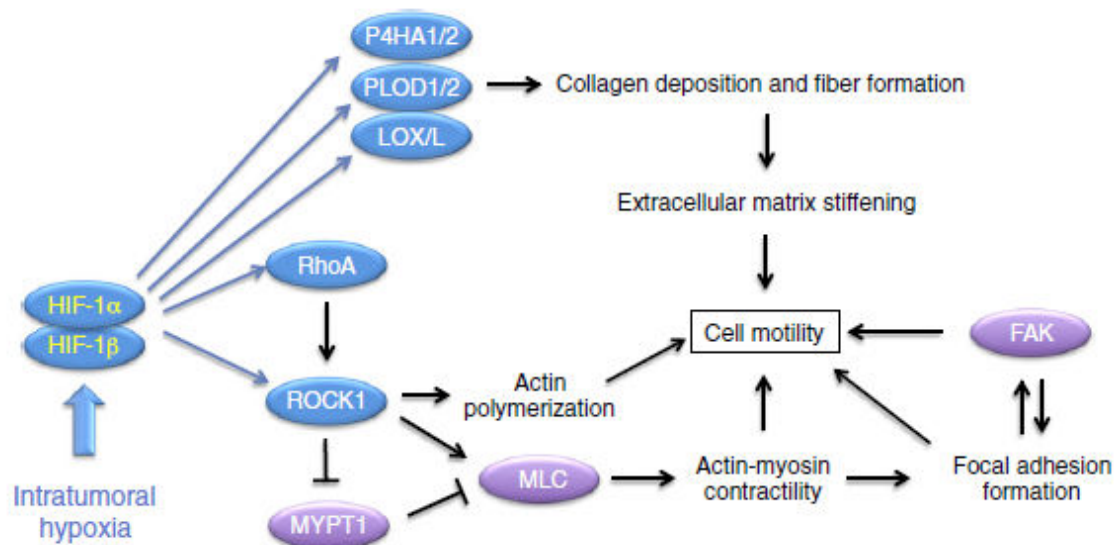
## 1. La voie RhoA/Actine/MKL1 & son implication dans la transformation tumorale

La transition épithélio-mésenchymateuse permettant la dissémination de cellules cancéreuses du foyer tumoral primaire s'accompagne d'un profond remodelage du cytosquelette. Elle se caractérise initialement par la rupture de jonctions épithéliales, impliquant l'E-cadhérine, permettant la perte de contacts cellulaires nécessaire à la réorganisation du cytosquelette, et donc à l'activation de MKL1 (Busche et al. 2008, 2010). De par son action favorisant la déformation mécanique des cellules, l'implication du facteur MKL1 dans la progression tumorale, et plus particulièrement dans les phénotypes de motilité et d'invasion a été étudiée dans plusieurs modèles cellulaires. En effet, il a été prouvé que des cellules MDA-MB-231 de cancer mammaire triple négatif et des cellules B16F2 de mélanome développent moins de métastases, lorsqu'elles sont traitées avec des shRNA dirigés contre les ARNm codant pour MKL1 ou bien pour SRF. L'absence du facteur MKL1 n'altère en rien leur capacité proliférative, mais abolit l'expression de gènes favorisant la migration et la dissémination, tels que MYH9 ou encore MYL9 (Medjkane et al. 2009). Le KO de la protéine LMO7 « Lim Domain Only 7 », une protéine favorisant l'activation du facteur MKL1, de même que l'inactivation de Stat3 coopérant avec MKL1 pour favoriser le potentiel invasif, sont également associés à une inhibition du potentiel invasif des cellules MDA-MB-231 (Hu et al. 2011; Liao et al. 2014). De plus, l'activation du facteur MKL1 a également été associée à l'apparition de propriétés migratoires, voire mésenchymateuses, dans le cancer du pancréas et du poumon notamment (Scharenberg et al. 2010; Song et al. 2016). Par ailleurs, l'activité transcriptionnelle de MKL1 a été associée à l'expression de métallo-protéases nécessaires à l'invasion, telles que MMP2 dans le cancer de l'ovaire et MMP9 dans le cancer du poumon (Cheng et al. 2015; Xu et al. 2017).

## 2. Lien entre Hypoxie et MKL1

Le dernier article cité, (Cheng et al. 2015) montre que le recrutement de MKL1 au niveau des séquences régulatrices du gène MMP9, permet le recrutement de la méthyl-transférase ASH2 qui appose la marque d'activation transcriptionnelle H3K4me3. Dans cette étude, les auteurs provoquent l'activation du facteur MKL1 en plaçant leurs cellules de cancer du poumon A549 en condition de sous-oxygénation et démontrent élégamment comment l'hypoxie contribue à la motilité cellulaire d'un point de vue mécanistique (Cheng et al. 2015). Le facteur MKL1 constitue donc un relais transcriptionnel de capacités pro-invasives initiées par l'hypoxie. Cela est renforcé par le fait que, sous hypoxie, s'opère un recrutement du facteur HIF1 $\alpha$  au niveau des gènes codant pour RhoA et ROCK1, les

kinases activées en amont du facteur MKL1 (Gilkes et al. 2014). Ce mécanisme permet de potentialiser l'activité des kinases FAK « Focal Adhesion Kinase » et MLCK « Myosin Light Chain Kinase », très largement décrites pour favoriser la migration cellulaire (**Figure 28**). Par ailleurs, l'activation des kinases RhoA et Rock1 est fréquemment retrouvée *in vivo* dans des carcinomes invasifs et métastatiques (Wang et al. 2004; Bellizzi et al. 2008; Lane et al. 2008).

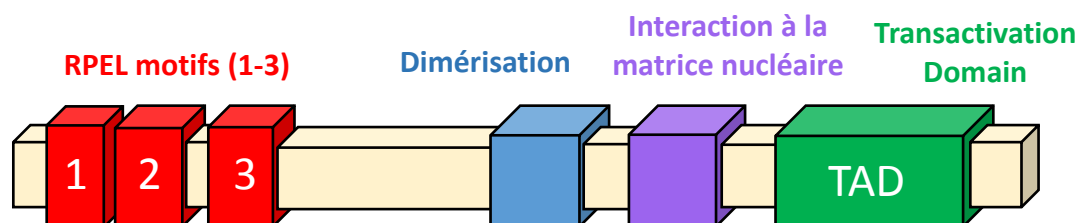


**Figure 28: Interrelations entre l'hypoxie et la motilité cellulaire.**

Sous pression hypoxique, le facteur HIF1α induit l'expression des protéines RhoA et ROCK1 favorisant la polymérisation d'actine, notamment par activation du facteur MKL1. L'hypoxie favorise également l'activation par phosphorylation de la protéine MLC (Myosin Light Chain) et de la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase). Ces deux protéines permettent le raidissement de la matrice extracellulaire indispensable à la motilité cellulaire reposant la contractilité actine/myosine. Par l'activation de cette voie de signalisation, l'hypoxie peut favoriser la migration cellulaire. (En bleu et violet, il s'agit des facteurs régulés par l'hypoxie au niveau transcriptionnel et post-traductionnel respectivement). Adapté de Semenza et al. 2016.



## MKL1



## $\Delta 200N$ – MKL1

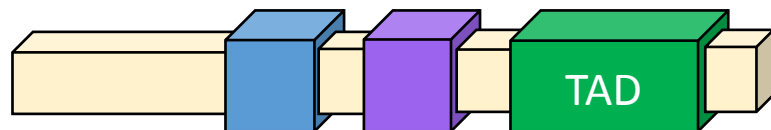


Figure 29 : Structure schématique de la protéine MKL1 et du mutant constitutivement actif  $\Delta 200N$  MKL1.

MKL1 possède deux domaines fonctionnels majeurs à chaque extrémité. A l'extrémité NH2 terminale, on distingue plusieurs motifs d'interaction avec l'actine G, constitués de 4 acides aminés successifs R, P, E, L. A l'extrémité opposée se localise la fonction de transactivation (TAD) par laquelle MKL1 recrute des co-activateurs transcriptionnels et exerce son activité génomique. Le mutant  $\Delta 200N$  – MKL1 correspond à une version dominante positive du facteur MKL1 possédant une activité génomique constitutivement active. Ce mutant stablement transfecté en cellules MCF7 nous a permis d'étudier l'activité d'ER $\alpha$  dans un contexte cellulaire de type mésenchymal.

### 3. MKL1 et son influence sur l'activité d'ER $\alpha$

L'activation du facteur MKL1 dans des cellules épithéliales s'accompagne d'un changement global d'orientation cellulaire. En effet, l'équipe a démontré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de la protéine MKL1 dans un modèle cellulaire MCF7 induit une transition épithélio-mésenchymateuse totale (EMT), caractérisée par l'expression de gènes typiquement mésenchymateux, tels que l' $\alpha$ SMA. La surexpression de MKL1 influence de façon globale l'état de la chromatine, caractérisé par une forte accumulation de la marque H3K9Ac et une inhibition de la marque H3K9Me3, typique des cellules dédifférenciées (Flouriot et al. 2014; Jehanno et al. 2016, 2017).

Comme cela a été décrit au début de ce manuscrit, l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  est très largement dépendante du contexte cellulaire associé. En effet, la fonction AF1 dicte principalement l'activité d'ER $\alpha$  dans des cellules différenciées comme les cellules HepG2 alors que celle-ci repose principalement sur AF2 dans des cellules dédifférenciées comme les Hela (Mérot et al. 2004). Le changement d'état cellulaire imposé par l'activation de la voie RhoA/MKL1 n'est donc pas sans conséquence sur l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . En effet, l'équipe a démontré que l'activation de cette voie s'accompagne d'une inhibition de la fonction de transactivation AF1 et une permutation vers AF2 comme fonction principale de transactivation d'ER $\alpha$  (Huet et al. 2009). L'équipe s'est donc intéressée de manière plus approfondie aux conséquences de l'activation du facteur MKL1 sur la sensibilité hormonale des cellules cancéreuses mammaires. Elle a également montré que le facteur MKL1 était localisé au niveau cytoplasmique (donc inactif) dans les lignées cancéreuses mammaires différenciées et exprimant ER $\alpha$  telles que les lignes cellulaires MCF7 et T47D et est au contraire nucléaire dans des lignées de cancer du sein de phénotype ER $\alpha$ -négatif (HMT-3522 T4-2 et MDA-MB - 231) ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse (Kerdivel et al. 2014). Par ailleurs, l'expression constitutive du facteur MKL1 dans des cellules MCF7 participe de la mise en place d'un phénomène de résistance hormonale. En effet, nous avons constaté une inhibition de l'activité de transactivation d'ER $\alpha$  sur un panel de gènes cibles en qPCR, tels que CXCL12 ou PR (Kerdivel et al. 2014), ainsi qu'une expression œstrogéno-indépendante de facteurs de croissance tels que HB-EGF, TGF $\alpha$  et l'amphiréguline. A cela est associée une répression du récepteur HER2 et une augmentation de l'expression du récepteur EGFR/HER1. Le profil d'expression résultant (ER $\alpha$ -, PR-, HER2-, HER1+) correspond typiquement au profil d'expression des cancers du sein triples négatifs. La mise en place de la voie Rho/actine/MKL1 semble rendre compte en partie de l'échappement des cellules tumorales mammaires au contrôle hormonal. Son impact sur la signalisation œstrogénique repose à la fois sur

une reprogrammation cellulaire générale dictée par des modifications épigénétiques et des changements de propriétés fonctionnelles d'ER $\alpha$ . Nous disposons donc d'un excellent modèle d'étude afin de caractériser, cette fois-ci de façon globale, l'activité du récepteur dans des cellules transformées.

## Contexte et Objectifs des travaux de thèse

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont le fruit de trois années passées à l'IRSET (Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail) U1085 INSERM au sein de l'équipe Transcription, Environnement et Cancer (TREC), dirigée par le docteur Farzad PAKDEL. Ces travaux ont été réalisés sous la supervision des Dr Denis MICHEL, Gilles FLOURIOT et Pascale Le GOFF.

Depuis de nombreuses années, l'équipe d'accueil s'intéresse aux mécanismes fondamentaux par lesquels les œstrogènes et leurs récepteurs, notamment le récepteur-alpha des œstrogènes (ER $\alpha$ ), agissent sur l'orientation cellulaire, favorisant ainsi de nombreuses pathologies dont le cancer du sein. Quatre axes de recherche ont été développés par l'équipe. Le premier axe de recherche concerne la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  et la compréhension de l'influence du contexte cellulaire sur la contribution relative des fonctions de transactivation du récepteur. Ainsi, il a été démontré que des cellules différenciées comme les cellules HepG2 arborent un contexte cellulaire dit « AF1 permissif » car l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$  repose principalement sur sa fonction AF1. A l'inverse, dans des cellules dédifférenciées, voire mésenchymales comme les cellules Hela, le contexte cellulaire associé est qualifié de « AF2-permissif » car c'est principalement par la fonction AF2 qu'ER $\alpha$  va exercer son activité transcriptionnelle. L'analyse a été menée sur plusieurs modèles cellulaires et notamment des cellules épithéliales mammaires dans un contexte de cancérogénèse. Le deuxième axe de recherche traite de l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le phénomène d'échappement des cellules tumorales mammaires au contrôle hormonal. L'équipe s'est intéressée tout particulièrement à l'influence du facteur COUP-TFI puis à la voie de signalisation Rho/Actine/MKL1, deux éléments étroitement associés à la transition épithélio-mésenchymateuse et qui affectent fortement la fonction transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . Cette étude est étroitement associée au premier axe de recherche. Le troisième axe concerne l'identification des mécanismes impliqués dans le contrôle œstrogénique de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose. L'équipe s'emploie notamment à déterminer la part des effets transcriptionnels et non-transcriptionnels du récepteur et à donner une description détaillée des éléments et des cascades d'événements mis en jeu. Enfin, les données et outils acquis au cours de ces diverses études servent de base à un criblage de xéno-œstrogènes (perturbateurs endocriniens, phyto-œstrogènes) et à l'établissement de critères de

sélection dans la recherche de molécules présentant une activité modulatrice sélective des fonctions d'ER $\alpha$  (SERMs) et d'intérêt pharmacologique. Ce travail est développé dans le quatrième axe de recherche.

S'inscrivant dans la continuité des deuxième et troisième axes de recherche de l'équipe, mon activité scientifique sur ces trois dernières années s'est concentrée sur l'étude de deux voies de signalisation, la signalisation hypoxique d'une part, et la voie actine/MKL1 d'autre part, et la compréhension des mécanismes par lesquels celles-ci peuvent moduler l'activité du récepteur aux œstrogènes (ER $\alpha$ ) dans les cellules cancéreuses mammaires.

L'arrivée de la thématique hypoxie au sein de l'équipe est mon initiative. En effectuant un travail bibliographique, j'ai pu constater que certaines études établissaient un lien entre l'activation de la voie RhoA/actine/MKL1 et l'appauvrissement du microenvironnement cellulaire en oxygène (hypoxie). Par ailleurs, des études récentes établissent un lien de plus en plus net entre l'hypoxie et la résistance endocrine dans les cancers mammaires ER $\alpha$  (+). La curiosité intellectuelle m'a poussé à me demander dans quelle mesure l'hypoxie pouvait d'une part moduler l'activité génomique d'ER $\alpha$ , mais également interférer avec le facteur MKL1. Voilà comment ma thèse a abouti à l'étude parallèle mais également comparée des effets de l'hypoxie et de la voie MKL1 sur la signalisation œstrogénique, dans un modèle de cellules cancéreuses mammaires.

Le lecteur de ce manuscrit se voit proposer deux articles principaux traitant des effets de l'hypoxie d'une part, et des effets de la voie MKL1 d'autre part, sur la signalisation œstrogénique en lignée cancéreuse mammaire MCF7. Les versions proposées sont proches de leur état final de différenciation ou plutôt devrais-je dire de publication... mais des corrections et peut être même des ajouts d'expériences complémentaires (surtout pour l'article hypoxie) restent envisageables. Une discussion générale remettra en perspective les résultats découlant de l'étude de ces deux voies de signalisation, et de leur conséquence sur la signalisation œstrogénique. Enfin, en annexe de ce manuscrit le lecteur trouvera deux articles supplémentaires qui ont occupé les premiers mois de ma thèse, avant que celle-ci ne se focalise sur l'étude du récepteur aux œstrogènes. Un résumé en français de ces travaux est présenté en début d'article.

# RESULTATS



# ARTICLE N°1





## ARTICLE N°1

### **Hypoxic modulation of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) transcriptional activity and binding to chromatin.**

Jehanno Charly<sup>1</sup>, Le Goff Pascale<sup>1</sup>, Habauzit Denis<sup>1</sup>, Le Page Yann<sup>1</sup>, Lecomte Sylvain<sup>1</sup>, Lecluze Estelle<sup>1</sup>, Percevault Frédéric<sup>1</sup>, Avner Stéphane<sup>2</sup>, Métivier Raphaël<sup>2</sup>, Michel Denis<sup>1\*</sup>, & Flouriot Gilles<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Rennes 1, Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail, INSERM U1085, Equipe TREC, Rennes, France

<sup>2</sup> Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, Equipe SP@RTE, Rennes, France

#### **\*Corresponding Authors**

Dr. Gilles Flouriot

INSERM U1085, IRSET, University of Rennes 1, Beaulieu Campus, 35042 Rennes cedex, France.

Phone: +33-2 23 23 68 04

Fax: +33-2 23 23 67 94

E-mail: [gilles.flouriot@univ-rennes1.fr](mailto:gilles.flouriot@univ-rennes1.fr)

Dr. Denis Michel

INSERM U1085, IRSET, University of Rennes 1, Beaulieu Campus, 35042 Rennes cedex, France.

Phone: +33-2 23 23 61 31

Fax: +33-2 23 23 50 55

E-mail: [denis.michel@univ-rennes1.fr](mailto:denis.michel@univ-rennes1.fr)

## ABSTRACT

A majority of breast tumors expresses estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) whose activity is associated with hormone-dependent proliferation and survival and is exploited for hormone therapy. Understanding the etiological factors responsible for endocrine resistance in these tumors is a major challenge. Hypoxia, to which solid tumors are chronically exposed, has been shown to have a determinant role in the resistance to endocrine therapy. Several studies pointed out that it promotes ER $\alpha$  downregulation both *in vitro* and *in vivo*, yet consequences of hypoxic signaling on ER $\alpha$  activity remain largely elusive. In the present study, we show using a transcriptomic analysis that CoCl<sub>2</sub> treatment mimicking hypoxia differentially affects the expression of ER $\alpha$ -responsive genes, some of them being strongly inhibited by hypoxia while others are upregulated. Chromatin immunoprecipitation of DNA coupled to high-throughput sequencing (ChIP-Seq) revealed a massive loss of ER $\alpha$  binding sites (ERBSs), which are preferentially located at vicinity of these hypoxia-inhibited genes. On the contrary, we detected a subset of ER $\alpha$  target genes being up-regulated by hypoxia. We suspect hypoxia-related transcription factors to interfere with ER $\alpha$  at the chromatin scale, as we detected ligand-independent enrichment of permissive histone mark H3K27ac in the regulatory sequences located near to these genes. Unexpectedly, ChIP-Seq analysis revealed enrichment in hypoxia-specific ERBSs, indicating partial redistribution of ER $\alpha$  cistrome. Taken together, our data define an important overlap of regulation between estrogenic signaling and hypoxia signaling, which might modulate hormone response in treatment.

## INTRODUCTION

Breast cancer is a heterogeneous pathology, either in histological terms, therapeutic responses and long-time survival. Breast tumors are generally classified into five subtypes (Luminal A, Luminal B, HER2 enriched, Basal-like and Claudin-Low), which are distinguished from one another by specific molecular markers which will determine therapeutic options (1–3). The most common and clinically relevant marker is the expression of the estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ), encoded by the *ESR1* gene, which is expressed in approximately 75% of all breast tumors, and signs the luminal A and B subtypes. ER $\alpha$  has a central role in hormone-dependent breast cancer, mainly by orchestrating, after 17-beta-estradiol (E2)-binding, the activation of transcriptional programs involved in cell proliferation and survival (4).

Tamoxifen or aromatase inhibitors based endocrine therapies are the standard choices to preclude hormone-dependent tumor outgrowth, yet it has been shown that resistance eventually occurs in approximately 30 to 40% of breast tumors (5). Endocrine resistance, resulting from either acquired mutations, tumor heterogeneity or micro-environmental cues, is a major challenge in treating breast cancers. The decrease or loss of ER $\alpha$  expression greatly enhance the risks of developing endocrine resistance (6, 7). For instance, luminal B tumors, which express lower amounts of ER $\alpha$ , are associated with a more unfavorable prognosis than luminal A tumors (8, 9). Furthermore, ER $\alpha$  negativity in breast cancers is one of the hallmarks of Basal-like and Claudin-Low subtypes, for which conventional targeted therapies are not adapted. Identification of etiological factors responsible for endocrine resistance is crucial to set up new therapeutic options. Among the miscellaneous factors that can interfere with the estrogenic signaling, micro-environmental hypoxia has been described as a potent disruptor of ER $\alpha$  expression both *in vitro* and *in vivo* (10). Hypoxia refers to low oxygen concentration and occurs when intra-tumoral oxygen becomes scarce, as observed in more than 50% of the solid tumors (11). For example, in normal breast tissue, oxygen tension is estimated to be around 60 to 70mmHg of pO<sub>2</sub> (8/9%) whereas it can drop down to < 8mmHg of pO<sub>2</sub> (< 1%) for severe hypoxia (12, 13). Hypoxia promotes a wide range of tumor malignant traits such as epithelial-mesenchymal transition (EMT), angiogenesis or metabolic reprogramming which are classified as “Hallmarks of cancer” (14, 15). These programs are governed by the evolutionarily conserved hypoxia-inducible factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ . In normoxia, HIF $\alpha$  factors are continuously addressed for proteasomal degradation by  $\alpha$ -ketoglutarate and oxygen-dependent prolyl-hydroxylase enzymes (PHD) and E3 ubiquitin-ligase von-Hippel Lindau (pVHL) (16, 17). Decreasing oxygen availability leads to HIF $\alpha$  stabilization and nuclear accumulation where it binds to HIF1 $\beta$  to activate gene transcription. It has been proposed that HIF1 $\alpha$  mostly drives the initial

response to hypoxia (2–24 h) of severe hypoxia or anoxia (<0.1% O<sub>2</sub>), whereas HIF2 $\alpha$  is more active under soft (<5% O<sub>2</sub>) or prolonged hypoxia (48–72h) (18, 19).

Conflicting studies co-exist in the literature in regards to the consequences of hypoxia on estrogenic signaling. Our work confirm hypoxia-induced down-regulation of ER $\alpha$  using CoCl<sub>2</sub> hypoxia mimetic agent on the ER $\alpha$ -positive breast cancer cell line MCF7, predominantly at the protein level, (10, 20). Few studies pointed out that hypoxia might regulate some ER $\alpha$ -responsive genes, yet consequences of hypoxia on ER $\alpha$  transcriptional activity and binding to chromatin remain almost completely unknown (21, 22). Our data demonstrate that hypoxia differentially regulates ER $\alpha$ -responsive genes, either by inhibiting or by enhancing their expression. CHIP-Seq experiment shows important reprogramming of ER $\alpha$  cistrome in hypoxia, with massive loss of ER $\alpha$  Binding Sites (ERBSs) and unexpectedly acquisition of hypoxia-specific ERBS.s Our work highlights an important role of hypoxia on estrogenic signaling and suggests that hypoxia might modulate efficacy of endocrine therapies.

## **MATERIEL AND METHODS**

### **Cell culture and treatments**

MCF-7 cells were routinely maintained in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Biowest) and antibiotics (GIBCO) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. When treatments with steroids were required, the cells were in phenol red free DMEM (GIBCO) supplemented with 2% dextran/charcoal-stripped FCS (dsFCS; Biowest) prior to the experiments. E2 and 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) were purchased from Sigma–Aldrich. Proteasomal inhibitor MG132 was purchased from Enzo Life Sciences. Hypoxic treatments were performed using chemical mimicking agent, cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>), from Sigma–Aldrich. MCF7 cells were exposed for one month in presence of 200 $\mu$ M of CoCl<sub>2</sub> to induce hypoxia. Rescued cells were obtained after one month of recovery in CoCl<sub>2</sub>-free media.

### **Proliferation assay and TUNEL assay**

For proliferation assay, 10000 MCF7 cells were plated in 24-well plates and then culture in steroid free medium 2% FBS for 24h. Then, cells were treated with either E2 (10nM) or 4OHT (1 $\mu$ M) for 6 days. After treatment, cells were trypsinized, and the cell number was determined using a TC10 Automated Cell Counter (Bio-Rad). The terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used to measure the level of apoptotic cells as defined by detecting DNA fragmentation (In Situ Cell Death detection kit from Roche).

### **Cell cycle analysis by flow cytometry (FACS)**

After 48h of hormone stimulation, cells were trypsinized and resuspended in IFA buffer (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, FBS 4%). Cells were fixed with ice-cold 70% ethanol for 30 minutes, rinsed with PBS and permeabilized with IFA buffer/0.5% Tween. RNAs were eliminated by RNase A (100ug/ml) treatment for 1h at room temperature, and then cells were incubated with propidium iodide 1mg/ml, for 30 minutes. The suspension was filtered through a nylon mesh prior to analysis using a FACS Calibur Flow Cytometer (BD Bioscience). For each condition, 20000 cells were counted.

### **Antibodies and immunofluorescence**

The primary antibodies used for western blotting and immunofluorescence analyses are described as follow: ER $\alpha$  (HC-20, Santa Cruz, sc-543), ERK (Santa Cruz, sc94), HIF1 $\alpha$  (Abcam, ab2185) and HIF2 $\alpha$  (Abcam, ab199). For western blotting, the peroxidase-conjugated secondary antibodies directed against rabbit or mouse constant fragments were purchased from GE HealthCare. For immunofluorescence, secondary antibodies coupled with 594 or 488 Alexa Fluor dye were obtained from Abcam. The cover slides were mounted in mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich). Images were obtained with an ApoTome Axio Z1 Imager microscope (Zeiss) and processed with Axio Vision Software. Fluorescence was quantified with ImageJ software from images obtained with identical exposure time.

### **Western blotting**

Cells were lysed in NP-40 lysis buffer (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate and 0.1% SDS) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche), or directly lysed into 2X Laemmli buffer. Whole protein extracted were denaturated at 95°C for 5 min, subjected to sonication (Bioruptor) and transferred on nitrocellulose membrane (GE HealthCare) after being separated on SDS polyacrylamide gel. Primary antibodies were incubated in TBS milk 5% supplemented by 0.1% of Tween (Sigma-Aldrich).

### **RNA extraction and RT qPCR**

RNA extractions were performed using RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Retrotranscription was performed on 1  $\mu$ g of RNA with random primer using iScript Reverse Transcription Supermix purchased from Biorad. Quantitative RT-qPCRs were performed using the iQ™ SYBR\_ Green Supermix from BioRad on CFX384 Touch Real Time PCR Detection (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). TBP was used as internal control, and the primer sequences used for qPCR reaction are indicated [in supplementary table 1](#).

## **Microarray**

MCF-7 were cultured in phenol red free DMEM (GIBCO) supplemented with 2% dextran/charcoal-stripped FCS (dsFBS; Biowest) 72 h prior to the experiments. Then cells were treated for 8 h with EtOH or 10 nM of E2. After treatment, control, CoCl<sub>2</sub>-treated and rescued cells were immediately harvested. Total RNA was purified using the RNeasy kit (Qiagen) and quantified using the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology, Cambridge, UK), as previously described (23). The RNA quality was controlled with Bioanalyser and RNA integrity Number (RIN) were between 8.6 and 9.7.

A one-color whole gene expression modification analysis was performed using the Agilent Whole Human Genome 8x60K Microarray Kit (Agilent Technologies). Four replicates per condition were analyzed with the GeneSpring GX software (Agilent Technologies). Briefly, the expression profile was log<sub>2</sub>-transformed and normalized (Quantile), and 23 531 gene entities were eventually detected on the microarrays. Expression level-based filters (intensity greater than 125) were applied and finally the considered list contains 17 291 gene entities. The complete data set was deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo), GEO series accession number: XXXXXXXX).

## **Microarray analysis**

Gene entity list was filtered by fold change >1.5 between all condition. Gene expression modifications were then compared using an ANOVA followed by a post-hoc Tukey test. P-values were adjusted by controlling the false discovery rate (FDR) with the Benjamini & Hochberg (BH) correction for multiple testing. 15 direct side-by-side comparisons were performed. A gene was considered significantly differentially expressed if the adjusted p-value was below 0.05, and the absolute fold-change (FC) was above 1.8 at least in one comparison.

## **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**

Sub-confluent control, CoCl<sub>2</sub>-treated and rescued MCF7 cells were grown for 72h in phenol red-free DMEM (Invitrogen) containing 2% dextran/charcoal-stripped FCS (Biowest), and then treated for 10 nM E2 or ethanol (vehicle control) during 50 min. Cells were then washed twice with ice-cold PBS and cross-linked for 10 min with 1.5% formaldehyde (Sigma) and the reaction was stopped with 0.125 M glycine for 1 min. Following two washes in cold-PBS, cells were scraped into 500 µl PBS with protease inhibitors (Complete Inhibitors, Roche), spun 2 min at 3000 g and snap frozen to -80°C. After cell lysis in 300 µl of lysis buffer [10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB], ChIP was performed as previously described (24). Antibodies against ERα (HC-20, sc-543, Santa Cruz), H3K27ac (ab4729, Abcam) and H3K4me2 (07-030, Merk Millipore) were used in these assays. DNA was

purified on NucleoSpin columns (Macherey-nagel) using NTB buffer. ChIP experiments were performed from at least five biological independent replicates. Primers for real-time PCR are provided in Supplementary Materials ([supplementary Table 1](#)).

### **ChIP-sequencing (ChIP-seq) and ChIP-seq data analysis**

We pooled DNA originated from at least 20 different ChIP experiments conducted as described above. The ChIP DNA was prepared into multiplexed libraries and sequenced using an Illumina HiSeq apparatus at the GenomEast platform (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et cellulaire; Strasbourg, France). Pooled control inputs DNA were processed in parallel. Reads were aligned onto the indexed chromosomes of the human hg19 (GRCh37) genome using bowtie 0.12.7 (25), allowing at most two mismatches (parameters `-n 2; -l 28; -m 1` with `--best` and `--strata` options). Sequencing statistics are given in [supplementary Table 2](#). Extracted reads were then converted to .wig signal files, using samtools (26) and MACS (27) with default parameters. To restrict the inter-sample biases due to slightly different sequencing depths, the raw signals were normalized to the maximum depth obtained. The normalizing coefficient is indicated within the [supplementary Table 2](#). Peak calling was then operated as previously (24) using the algorithm described in (28) at different P-values threshold and the Input control file as reference. The .bed files containing the identified genomic coordinates of ERBSs were subsequently filtered against the lists of repetitive sequences obtained from the UCSC (blacklist; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin>). Regions exhibiting high background signal generated by a poor normalization to input due to excessive sequences overrepresentation (consecutive of the highly rearranged genome of MCF7 cells) were also removed. Identified genomic regions are provided in the [supplementary files](#). Motifs analyses were performed using SeqPos algorithm (<http://cistrome.org/ap/>) (29), and functional annotations were done under the GREAT web-platform (<http://great.stanford.edu/>) (30). All other integrative analyses of the ChIP-seq data were performed using home-made scripts and algorithms from the cistrome web-platform (<http://cistrome.org/ap/>).

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using Prism software. Statistical significance was determined using Mann-Whitney t-test and was indicated as follows: (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .



## RESULTS

### **Hypoxia affects MCF7 hormone dependent proliferation and survival of MCF7 cells.**

Previous works have demonstrated an inhibition of ER $\alpha$  expression upon both gas hypoxia and chemical mimetic agent cobalt chloride, CoCl<sub>2</sub> (31). We confirm by western blot the decrease in ER $\alpha$  expression in MCF7 exposed to both CoCl<sub>2</sub> and gas hypoxia (supplementary figure 1A & 1B). Hence, in the following experiments, hypoxia will be performed using CoCl<sub>2</sub> treatment only. Down-regulation of ER $\alpha$  was similar after 24h (supplementary figure 1A) or 1 month (figure 1A) of CoCl<sub>2</sub> treatment. In parallel, nuclear translocation of both hypoxia-inducible factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  was validated by immunofluorescence for these two durations of hypoxic stress (supplementary figure 2). Since tumors are submitted to chronic hypoxia *in vivo*, we decided to privilege one-month hypoxia exposure in the subsequent experiments. Comparison of ER $\alpha$  changes at mRNA and protein levels indicates that ER $\alpha$  loss during hypoxia occurs mainly at the protein level. Corroborating this, ER $\alpha$  protein amount was restored by co-treating MCF7 cells with the proteasome inhibitor MG 132. Cell counting experiments show complete disruption of E2-induced proliferation when MCF7 cells are exposed to CoCl<sub>2</sub> (figure 1B). Even a high serum concentration (10%) only partially restores E2-dependent proliferation (supplementary figure 1D). In contrast to cell numeration, FACS analysis shows that hypoxia increases the percentage in S-phase in untreated MCF7 cells, rising from 8.7% to 13.6 % (figure 1C). In presence of E2, control and CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells present similar percentage of cells in S-phase (19.9% vs 17.7% respectively). 4-OHT treatment only partially prevents S-phase entry in CoCl<sub>2</sub>-treated cells, with 10.7% of cells remaining in S-phase compared to 4.6% in untreated cells. FACS results clearly recall endocrine resistance. Finally, TUNEL experiment shows a 3-fold increase in cell death, and a complete loss of E2-mediated protective effects in CoCl<sub>2</sub>-treated cells. This result suggests that cell death might balance the increased in percentage of cells in S-phase, explaining the absence of E2-induced growth in cell numeration experiments.

### **CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia differentially affects the ER $\alpha$ transcriptional response.**

The transcriptional response to E2 under hypoxia was then analyzed by microarray to study ER $\alpha$  transcriptional activity. We compared mRNA accumulations between control and CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells after 8h of treatment with 10nM E2 or EtOH as vehicle control, by differential gene expression (DE) analysis using a cutoff of adjusted *P*-value < 0.05 and fold change >  $\pm$ 1.8. Bioinformatics analyses revealed that CoCl<sub>2</sub> exposure induces massive transcriptional response with

896 differentially expressed genes. Functional annotation using DAVID online software reveals that the majority of the CoCl<sub>2</sub>-specific differentially expressed genes responds to classical hypoxic pathways such as metabolic reprogramming and glycolysis (supplementary figure 3). Transcriptional network reconstruction using AMEN (32) confirms that, as expected, most of these differentially expressed genes are direct or indirect HIF1 $\alpha$  and/or HIF2 $\alpha$ -target genes (supplementary figure 4).

In parallel, E2 significantly induces the differential expression of 584 genes (figure 2A). Differential gene expression analysis revealed that 245 genes are commonly regulated in control and CoCl<sub>2</sub> treated MCF7 cells, upon E2 stimulation. CoCl<sub>2</sub> exposure impairs the regulation by E2 of 273 genes. However, the majority of these genes (around 200) have a fold change comprised between 1.5 and 1.8, indicating that the loss of regulation by hypoxia is relatively modest. Only 70 genes have a significantly impaired expression in hypoxia upon E2 treatment with a FC falling below 1.5. Consistently with the impaired E2-dependent proliferation previously described, some of these genes are involved in proliferation such the chemokine CXCL12 or the phosphatase CDC25a. Surprisingly, 66 genes are newly regulated by E2 upon CoCl<sub>2</sub> exposure (47 up-regulated, 19 down-regulated genes), with, however, a modest gain of regulation. Indeed, mean of fold change after E2 stimulation increases only from 1.6 in control cells to 2.1 in hypoxia. These results are confirmed by scatter plot analysis showing similar Log<sub>2</sub> fold change after E2 treatment between control and CoCl<sub>2</sub>-treated cells, for the majority of the E2-responsive genes (figure 2B). Strengthening this observation, ERE-luciferase reporter gene experiments show that ER $\alpha$  transactivation is not altered by CoCl<sub>2</sub> treatment (data not shown).

A heatmap was then built to cluster all the differentially expressed genes after CoCl<sub>2</sub> and E2 treatment (figure 2C). Clustering allows the identification of two clusters (C1 and C2) which correspond to genes which are up-regulated or down-regulated, respectively, by hypoxia only. Clustering also identified five groups of genes that are both responsive to CoCl<sub>2</sub> exposure and E2 treatment (Clusters C3 to C7). Clusters C3 and C4 define genes that are down regulated by E2, whose basal expression level is decreased and increased, respectively. Figure 2D offers better visualization of these clusters by classifying genes in function of their basal expression level in an ascending order.

Clusters C5, C6 and C7 correspond to genes positively regulated by E2. Classification of these genes in an ascending order according to their basal expression level is presented in figure 2E. Cluster C5 corresponds to a subset of genes exhibiting an important decrease in their basal expression level in hypoxia. Representative genes of this cluster, such as PGR, CXCL12 or HCK were confirmed by quantitative RT-qPCR analyses (figure 2F, upper panel). Cluster C6 refers to a subset of genes displaying similar expression pattern between control and CoCl<sub>2</sub>-treated cells. CDC25a, NTN1 and SGK1 belonging to this cluster were confirmed by RT-qPCR (figure 2F, middle panel). Finally, cluster

C7 corresponds to a subset of genes, whose expression is concomitantly up-regulated by E2 and CoCl<sub>2</sub> treatment. AREG (amphiregulin), GREB1 and KDM4B belong to this cluster and their profile was confirmed by RT-qPCR ([figure 2F, lower panel](#)). Altogether, these results reveal an important interplay between estrogenic and hypoxic signaling.

In conclusion, CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia differentially affects the ER $\alpha$  transcriptional activity, mostly by modulating the basal expression level of E2-regulated genes, rather than disrupting their corresponding E2 fold-change.

### **Reprogramming of ER $\alpha$ binding to chromatin by CoCl<sub>2</sub>**

In order to identify the underlying mechanisms involved in the differential E2-target gene expression in hypoxia, ER $\alpha$  binding sites (ERBSs) were analyzed on chromatin genome-wide by CHIP-Seq, in CoCl<sub>2</sub>-exposed and control MCF7 cells. To this aim, MCF7 cells were treated with E2 or EtOH for 50 minutes, which corresponds to an optimal time to capture ER $\alpha$  binding to chromatin (33). Bioinformatics treatment of the data, including filtration and identification of the optimal p-value per conditions ([supplementary figure 5](#)), was performed as described in the material and methods. Comparison of the retained ERBSs in untreated and E2-treated control and hypoxic cells is illustrated in the venn diagrams of [figures 3A and 3B](#). Mean ChIP-seq signals measured on each specific subset of ERBSs are shown on the bottom of each Venn diagram. In control MCF7 cells, 3896 and 22452 ERBSs were detected in untreated and E2-treated cells, respectively, reaching a total of 26348 identified ERBSs. In hypoxic MCF7 cells, a massive decrease in the number of ERBSs was observed. 3609 ERBSs were still detected in absence of hormone, while E2 stimulation mobilizes 5716 ERBSs only, which corresponds to an almost 4-fold drop in the number E2-induced ERBSs in comparison with control cells. The fixation of ER $\alpha$  on conserved ERBSs was also strongly reduced in hypoxia. CHIP-Seq analysis further shows a partial reprogramming of ER $\alpha$  cistrom upon CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic stress, as demonstrated by the identification of 1042 new ERBSs in hypoxia ([figure 3B](#)). DNA motif analysis of these new ERBSs shows depletion in ERE when ERE remains the main motif in conserved ERBSs (data not shown). Furthermore, a comparison of the news ERBSs with published binding sites of other transcription factors in MCF7 cell reveals weak clusterization, with notably a depletion for pioneer factors GATA3 or FOXA1 binding, indicating that the news ERBSs are particular and non-conventional ([supplementary figure 6](#)).

As previously explained, transcriptomic analysis revealed differentially expressed genes in hypoxia, with E2 up-regulated genes being clustered based on their basal expression level into three different categories, C5 to C7. As a reminder, basal expression level exhibits reduced (C5), similar (C6)

or enhanced (C7) regulation in hypoxia. To determine whether changes in the basal expression level of these genes were correlated with changes in ER $\alpha$  mobilization, we identified, from the 3 categories, the closest ERBSs from their transcription start site (TSS). Results show impaired dynamic of ER $\alpha$  binding following E2 treatment, regardless of the considered cluster (figure 3C). These results suggest that ER $\alpha$  ability to bind chromatin in hypoxia is inhibited all across the genome. Furthermore, there is no obvious correlation between variations in the basal expression level of the genes and the intensity of ER $\alpha$  binding at the vicinity of these genes in E2-untreated hypoxic MCF7 cells. We next determine if the new and lost ERBS were specific to any cluster (figure 3D). Interestingly, cluster C5, which display decreased gene expression in hypoxia, also display the higher loss of ERBSs since 57.1% of its genes are neighboring to lost ERBSs in hypoxia. On the contrary, the two other clusters C6 and C7 of genes with unchanged or increased basal expression levels in presence of CoCl<sub>2</sub> have only 1.1% and 3.3% of ERBSs loss. More importantly, they were enriched in CoCl<sub>2</sub>-induced ERBSs, with respectively 57.4% and 40% of the genes located at the vicinity of the newly acquired ERBSs. These results might suggest a mechanism of compensation for the genes of clusters C6 and C7. Indeed, the globally reduced binding of ER $\alpha$  seems to be compensated by the creation of new ERBSs at the vicinity of these genes in hypoxia.

Then, in order to validate some previously identified ERBSs, we conducted new CHIP experiments targeting ER $\alpha$  and histone marks specifically associated with active enhancers: H3K27Ac and H3K4me<sub>2</sub>. CHIP experiments on conserved ERBS at the vicinity of genes belonging to clusters C5, C6 and C7 confirms the inhibition of ER $\alpha$  recruitment to chromatin in absence and in presence of E2, regardless of the category (figure 3E). Interestingly, H3K27Ac was found specifically enriched at ERBSs located near to genes belonging to cluster C7 upon CoCl<sub>2</sub> treatment. In hypoxia, these ERBSs seem to be already prepared before E2-induced ER $\alpha$  binding to chromatin. Figure 3F presents the results for two specific CoCl<sub>2</sub>-induced ERBSs on chromosome 2 and 14 and confirms their enrichment in ER $\alpha$  binding and in active chromatin histone marks H3K27Ac and H3K4me<sub>2</sub> in hypoxia. These data also indicate that new ERBSs were in a poised/prepared state in CoCl<sub>2</sub> treated cells, only.

Altogether, these results indicate that hypoxia interferes with estrogenic signaling at the chromatin scale, causes a significant loss of ERBSs and reduces the recruitment of ER $\alpha$  at conserved ERBSs. For some genes, this reduced recruitment of ER $\alpha$  appears to be compensated by the appearance of new ERBSs, and by a specific enrichment of permissive histone marks, possibly driven by hypoxia specific transcription factor(s).

### **Hypoxia is reversible in regards of estrogenic sensitivity**

At last, in order to assess whether hypoxia was a reversible phenomenon in regard of estrogenic sensitivity, we exposed MCF7 cells for one month to CoCl<sub>2</sub> before a one month recovery in normal medium. These MCF7 cells are called “Rescue”. First, western-blot shows a complete recover of ER $\alpha$  expression at the protein level (figure 4A). Then, cell numeration shows similar profiles between control and rescued cells, indicating that the E2-induced proliferation is fully restored after one month of growth in CoCl<sub>2</sub> free media (figure 4B). Microarray-based analysis shows that gene expression profile in control cells was recovered in rescued MCF7 cells (figures 4C and 4D). Bioinformatics analysis revealed that the gene expression profile between control and rescued MCF7 are very close with only 55 genes being differentially regulated with a fold change of 1.8 (49 down-regulated and 6 up-regulated genes, corresponding to cluster C1 and C2 in figure 4D). Interestingly, more than 50% of them were also differentially expressed in CoCl<sub>2</sub> treated cells (data not shown). Functional annotation indicates that a fraction of these genes is related to immune response and antigen presentation by MHC2.

Concerning E2-regulation, the Venn diagram presented in figure 4C shows that 626 genes are differentially expressed by E2 in control and rescued MCF7 cells. Most of these genes are commonly regulated (409), with only a hundred genes which are specific to each condition. Differences in the mean of E2-fold change between control and rescued cells in the two subgroups is however less than 1.2 fold change, indicating an almost complete recovery of E2-gene transcriptional regulation in rescued MCF7 cells. Heatmap presented in figure 4D includes all genes that are differentially expressed between control and rescued MCF7 cells, in presence or absence of E2. While clusters C1 and C2 refer to E2-non responsive genes differentially expressed between control and rescued cells, clusters C3 and C4 refers to genes whose expression is down and up-regulated by E2, respectively. As expected, clustering was unable to discriminate subset of genes based on their basal expression level in absence of hormone, contrarily to previously describe in hypoxia (figure 2C).

Finally, CHIP-Seq experiment against ER $\alpha$  in the rescued MCF7 cells was performed, allowing comparisons of ER $\alpha$  cistromes between control, CoCl<sub>2</sub>-treated and rescued MCF7 cells. In rescued MCF7 cells, 5316 and 25550 ERBSs were detected in untreated and E2-treated cells, respectively. This result is very similar to the profile observed in control MCF7 cells (figure 4E). A multiple comparison of all ERBSs detected in the three conditions (control, CoCl<sub>2</sub> and rescue) reveals that almost three quarters of the ERBSs that were lost in CoCl<sub>2</sub>-treated are remobilized in the rescued cells (figure 4F). Taken together, all these data demonstrate that the impact of hypoxia in regards of estrogenic signaling is globally reversible.

## DISCUSSION

Most patients with ER $\alpha$ -positive breast cancers benefit from antiestrogen therapy. Unfortunately, endocrine resistance remains a clinical challenge, with few effective treatments available for patients with antiestrogen-resistant breast cancers. Previous work on breast cancer cell lines highlighted a role for hypoxia in inhibiting ER $\alpha$  expression and E2-mediated proliferation. We show that CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia reduces ER $\alpha$  expression mainly at the protein level, confirming work from Padro et al. (2017) (50). A Previous study suggests that loss of ER $\alpha$  protein expression is not directly associated with HIF1 $\alpha$  since stable transfection of HIF1 $\alpha$  in MCF7 cells do not inhibit ER $\alpha$  expression in normoxia (21). Hence, ER $\alpha$  loss might depend on HIF2 $\alpha$  or result from a hypoxic cellular environment that influence factors responsible for ER $\alpha$  proteolysis, eventually through the activation of E3 ubiquitin ligase system. Of note, we observe HSP70 nuclear accumulation and HSP70/ER $\alpha$  interaction upon hypoxic stress (data not shown), which could point CHIP E3-ligase as a putative actor for ER $\alpha$  degradation (34). Otherwise, HIF $\alpha$  ubiquitin ligase pVHL has also been reported to promote ER $\alpha$  degradation in renal carcinoma cells in hypoxia (35). Identifying the degradation pathway might be crucial to prevent loss of ER $\alpha$  expression and thus escape from the establishment of endocrine resistance.

Regarding proliferation of breast cancer cells in hypoxia, conflicting studies coexist in the literature. Previous work showed no proliferation of MCF7 cells upon hypoxic pressure in presence of E2. Other authors report in contrast a hormone-independent proliferation of MCF7 stably expressing HIF1 $\alpha$  (21, 36). Likewise, HIF2 $\alpha$  was a potent inhibitor of proliferation in some studies while, in others, it enhances autocrine growth signaling through AREG and EGFR/ErbB4 expression (37, 38). In the present study, a hormone-independent S-phase entry was observed in CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells, suggesting that hypoxia might induce hormonal escape of the E2-responsive MCF7 cell line (figure 1C). Supporting the observation, transcriptomic analysis reveals that genes promoting endocrine resistance such as AREG, EGFR and ERBB4, were also up-regulated by hypoxia, in agreement with work of Stiehl et al. (2011) (37) (supplementary figure 7A). But intriguingly, cell numeration experiments show in contrast almost no increase in the number CoCl<sub>2</sub>-treated cells, even in presence of E2 (figure 1B). Several mechanisms might explain these contrasting results. First, we show that CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia is associated with increased cell death and loss of E2-mediated protection against apoptosis (figure 1D). Of interest, transcriptomic analysis revealed that CoCl<sub>2</sub>-treatment enhances the expression of BNIP3 (supplementary figure 7C), a ligand positively regulated by HIF1 $\alpha$  which, when secreted in the extracellular space, acts as a major apoptosis-inducer (39, 40). Furthermore, our preliminary data indicate that hypoxia promotes AKT inhibition (data not shown),

which is consistent with reduced survival (40, 41). As previously reported (42), our transcriptomic analysis also highlights up-regulation of cell-cycle arrest genes such as p21 and GADD45a (43, 44), and cell growth machinery arrest genes such as DDIT4 (45) in hypoxia (supplementary figure 7B). Finally, we observe that CoCl<sub>2</sub> treatment impairs E2-upregulation of the proliferative chemokine CXCL12 (46) and of CDC25a phosphatase involved in G2/M transition (47), thereby possibly contributing to the inhibition of E2-induced proliferation. Taken together, these results indicate that increase of cells in S phase in hypoxia is counterbalanced by an enhancement of cell death, thus contributing to the apparent cell quiescence in numeration experiments (48). These observations are consistent with previous studies suggesting that epithelial cells are more likely to reach a quiescent state when placed in hypoxia whereas transformed cells tend to proliferate more intensively (49).

Studies deciphering ER $\alpha$  transcriptional activity upon hypoxic pressure are almost lacking in the literature. The only available data were obtained from ERE-luciferase assays, showing either enhanced (31) or reduced (50) transactivation activity of ER $\alpha$  in hypoxia. Therefore, we aim studying ER $\alpha$  transcriptional activity in hypoxia through microarray-based approaches. Transcriptomic analysis shows that CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia differentially affects the ER $\alpha$ -mediated transcriptional response, mostly by modulating the basal expression level of E2-regulated genes, rather than disrupting their corresponding E2 fold-change.

Among up-regulated genes by E2, we discriminated subsets of genes whose basal expression was inhibited (C5), unchanged (C6) or increased (C7) by CoCl<sub>2</sub> exposure. In cluster C5, changes in gene regulation were therefore opposites between CoCl<sub>2</sub> and E2 treatment while, in cluster C6, there were additives. Several mechanisms might explain these data. First, genes belonging to cluster C5, such as PGR, CXCL12 or HCK, might be more dose-dependent sensitive to ER $\alpha$  protein content and therefore to its degradation. Corroborating this, CHIP-Seq analysis reveals that genes of cluster C5 were the most prone to lose ERBSs at their neighboring in CoCl<sub>2</sub>-treated cells. One could also hypothesize that lost ERBSs might be more degenerated and therefore preempted not to be used when ER $\alpha$  concentration is diminished (51). One could also propose that hypoxia-dependent genome reorganization might render chromatin less accessible at the vicinity of this subgroup of genes, thereby contributing to silence their expression. In parallel, we observe that more than 70% of these ERBSs are remobilized when the hypoxic stress is interrupted, indicating that the impact of hypoxia in regards of ER $\alpha$  binding to chromatin is globally reversible (figure 4F).

At the opposite of cluster C5, cluster C7 exhibits a subset of genes that are up-regulated both by E2 and hypoxia. These genes were more prone to be enriched in specific CoCl<sub>2</sub>-induced ERBSs at the vicinity of their transcription start site (TSS). We hypothesize that hypoxia-dependent opening of

the chromatin at specific enhancers might render non-conventional ERBS accessible to ER $\alpha$ , which therefore might contribute to sustain expression of this subset of genes in hypoxia. Interestingly, such redistribution of ER $\alpha$  cistrome was already detected in endocrine resistant tumors and in distant ER $\alpha$  metastases (52, 53). Altogether, these observations clearly show that ER $\alpha$  cistrome owns a certain degree of versatility or plasticity that is dependent on the associated cellular context. Reprogramming of ER $\alpha$  cistrome in hypoxia suggests that another transcription factor might prepare chromatin independently from ER $\alpha$ . We suspect HIF $\alpha$  factors to be responsible for the up-regulation of the basal activity of cluster C7's genes, as the ERBSs located at their vicinity display strong enrichment in H3K27Ac, even in the absence of E2. Interestingly, an overlap between HIF1 $\alpha$ /HIF2 $\alpha$  binding sites and ER $\alpha$  binding sites was already described at the vicinity of more than 200 genes in MCF7 cells (21). Preliminary bioinformatical analysis reveals that more than 75% of cluster C7's genes possess HIF $\alpha$  responsive elements at the vicinity of their TSS (data not shown). In this particular subset of genes, we found some genes particularly involved in malignant tumor progression, such as FOXC1, which is considered as a main EMT-inducer, especially in basal-like breast cancers (54), KDM4B, an also well-known oncogene promoting dedifferentiation (55, 56) or AREG, a growth factor capable of promoting hormone-independent proliferation (37). We also found that PGF, a potent angiogenesis-promoting factor (57) is regulated by both ER $\alpha$  and hypoxia. Likewise, VEGFa was previously reported to be regulated both by ER $\alpha$  and HIF1 $\alpha$  (58).

Further works need to be performed now to decipher specific implications of the transcription factors HIF1 $\alpha$  or HIF2 $\alpha$  in the hypoxic effects previously described. For instance, the use of siRNA or chemical pan-HIF $\alpha$  inhibitors such as the FM19G11(38, 36) should be informative. In conclusion, our study clearly show that hypoxia deeply impacts genomic ER $\alpha$  activity and suggests it might modulate or even inhibit the efficacy of endocrine therapies by selectively maintaining or even compensating expression of a specific subset of ER $\alpha$  responsive genes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the GET "Genome et Transcriptome" platform in Toulouse for performing micro-array hybridization and the IGBMC Microarray and Sequencing platform at Illkirch for CHIP sequencing. This work was supported by the University of Rennes 1, Inserm, and the Ligue Contre le Cancer.



## REFERENCES

1. A. Prat, C. M. Perou, Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5** (2011), pp. 5–23.
2. S. Guiu *et al.*, Molecular subclasses of breast cancer: How do we define them? The IMPAKT 2012 working group statement. *Ann. Oncol.* **23** (2012), pp. 2997–3006.
3. G. Viale, The current state of breast cancer classification. *Ann. Oncol.* **23** (2012), doi:10.1093/annonc/mds326.
4. J.-F. Arnal *et al.*, Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* **97**, 1045–1087 (2017).
5. K. Tryfonidis, D. Zardavas, B. S. Katzenellenbogen, M. Piccart, Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. *Cancer Treat. Rev.* **50** (2016), pp. 68–81.
6. S. R. D. Johnston *et al.*, Changes in Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and pS2 Expression in Tamoxifen-resistant Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **55**, 3331–3338 (1995).
7. M. Dowsett, in *Endocrine-Related Cancer* (2001), vol. 8, pp. 191–195.
8. Z. Li *et al.*, Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget.* **7**, 65024–65033 (2016).
9. V. N. R. Gajulapalli, V. L. Malisetty, S. K. Chitta, B. Manavathi, Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci. Rep.* **36**, e00432 (2016).
10. J. Kurebayashi, T. Otsuki, T. Moriya, H. Sonoo, Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res.* **92**, 1093–1101 (2001).
11. P. N. Span, J. Bussink, Biology of hypoxia. *Semin. Nucl. Med.* **45**, 101–109 (2015).
12. P. Vaupel, M. Hockel, A. Mayer, Detection and characterization of tumor hypoxia using pO<sub>2</sub> histography. *Antioxid Redox Signal.* **9**, 1221–1235 (2007).
13. B. Muz, P. de la Puente, F. Azab, A. K. Azab, The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 83 (2015).
14. D. Hanahan, R. A. Weinberg, Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell.* **144**, 646–674 (2011).
15. L. Schito, G. L. Semenza, Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer.* **2** (2016), pp. 758–770.
16. P. H. Maxwell *et al.*, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* **399**, 271–275 (1999).
17. W. G. Kaelin, P. J. Ratcliffe, Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell.* **30** (2008), pp. 393–402.
18. M. Y. Koh, R. Lemos, X. X.-P. Liu, G. Powis, The hypoxia associated factor (HAF) switches cells from HIF-1 $\alpha$  to HIF-2 $\alpha$  dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion.pdf. *Cancer Res.* **71**, 4015–27 (2011).
19. M. Y. Koh, G. Powis, Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* **37** (2012), pp. 364–372.
20. J. Cho, D. Kim, S. Lee, Y. Lee, Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-

- regulation involves hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1191–1199 (2005).
21. J. Yang *et al.*, Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15172–7 (2015).
  22. R. Seifeddine *et al.*, Hypoxia and estrogen co-operate to regulate gene expression in T-47D human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **104**, 169–179 (2007).
  23. D. Habauzit *et al.*, Transcriptome analysis reveals the contribution of thermal and the specific effects in cellular response to millimeter wave exposure. *PLoS One.* **9** (2014), doi:10.1371/journal.pone.0109435.
  24. J. Quintin *et al.*, Dynamic Estrogen Receptor Interactomes Control Estrogen-Responsive Trefoil Factor (TFF) Locus Cell-Specific Activities. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2418–2436 (2014).
  25. B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop, Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25 (2009).
  26. H. Li *et al.*, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* **25**, 2078–2079 (2009).
  27. J. Feng, T. Liu, B. Qin, Y. Zhang, X. S. Liu, Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat. Protoc.* **7**, 1728–1740 (2012).
  28. A. A. Sérandour *et al.*, Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res.* **40**, 8255–8265 (2012).
  29. T. Liu *et al.*, Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biol.* **12**, R83 (2011).
  30. C. Y. McLean *et al.*, GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* **28**, 495–501 (2010).
  31. J. M. Yi, H. Y. Kwon, J. Y. Cho, Y. J. Lee, Estrogen and hypoxia regulate estrogen receptor alpha in a synergistic manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 842–846 (2009).
  32. F. Chalmel, M. Primig, The Annotation, Mapping, Expression and Network (AMEN) suite of tools for molecular systems biology. *BMC Bioinformatics.* **9**, 86 (2008).
  33. R. Métivier *et al.*, Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell.* **115**, 751–763 (2003).
  34. Y. Tateishi *et al.*, Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.* **23**, 4813–23 (2004).
  35. Y. S. Jung, S. J. Lee, M. H. Yoon, N. C. Ha, B. J. Park, Estrogen receptor ?? is a novel target of the Von Hippel-Lindau protein and is responsible for the proliferation of VHL-deficient cells under hypoxic conditions. *Cell Cycle.* **11**, 4462–4473 (2012).
  36. X. Jia *et al.*, Basal and therapy-driven hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  confers resistance to endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast. *Oncotarget.* **6**, 8648–8662 (2015).
  37. D. P. Stiehl *et al.*, Non-canonical HIF-2 $\alpha$  function drives autonomous breast cancer cell growth via an AREG-EGFR/ErbB4 autocrine loop. *Oncogene.* **31**, 2283–2297 (2011).
  38. M. W. Alam *et al.*, HIF2 $\alpha$  contributes to antiestrogen resistance via positive bilateral crosstalk with EGFR in breast cancer cells. *Oncotarget.* **7** (2016), doi:10.18632/oncotarget.7167.

39. K. Guo *et al.*, Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ.* **8**, 367–376 (2001).
40. C. C. Feng *et al.*, Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 $\alpha$ -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression. *Growth Factors.* **34**, 73–86 (2016).
41. X. Zhang, N. Tang, T. J. Hadden, A. K. Rishi, Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1813** (2011), pp. 1978–1986.
42. N. Goda *et al.*, Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 359–69 (2003).
43. J. Wade Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **75**, 805–816 (1993).
44. S. Jin *et al.*, GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene.* **21**, 8696–704 (2002).
45. G. Di Conza *et al.*, The mTOR and PP2A Pathways Regulate PHD2 Phosphorylation to Fine-Tune HIF1 $\alpha$  Levels and Colorectal Cancer Cell Survival under Hypoxia. *Cell Rep.* **18**, 1699–1712 (2017).
46. A. Boudot *et al.*, Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One.* **6** (2011), doi:10.1371/journal.pone.0020898.
47. T. Shen, S. Huang, The role of CDC25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anti-Cancer Agents Med. Chem. ( ...)* **12**, 631–639 (2012).
48. E. M. Hammond, A. J. Giaccia, The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331** (2005), pp. 718–725.
49. E. Connolly, S. Braunstein, S. Formenti, R. J. Schneider, Hypoxia Inhibits Protein Synthesis through a 4E-BP1 and Elongation Factor 2 Kinase Pathway Controlled by mTOR and Uncoupled in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3955–3965 (2006).
50. M. Padró *et al.*, Genome-independent hypoxic repression of estrogen receptor alpha in breast cancer cells, 1–16 (2017).
51. C. M. Klinge, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2905–2919 (2001).
52. M. Lupien *et al.*, Growth factor stimulation induces a distinct ER(alpha) cistrome underlying breast cancer endocrine resistance. *Genes Dev.* **24**, 2219–27 (2010).
53. C. S. Ross-Innes *et al.*, Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature.* **481**, 389 (2012).
54. B. Han *et al.*, FOXC1: an emerging marker and therapeutic target for cancer. *Oncogene.* **36**, 3957–3963 (2017).
55. C. Wilson *et al.*, The histone demethylase KDM4B regulates peritoneal seeding of ovarian cancer. *Oncogene.* **36**, 2565–2576 (2017).
56. S. Li, L. Wu, Q. Wang, Y. Li, X. Wang, KDM4B promotes epithelial-mesenchymal transition through up-regulation of ZEB1 in pancreatic cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **47**, 997–1004 (2015).

57. P. Carmeliet *et al.*, Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**, 575–83 (2001).
58. D. Coradini, C. Pellizzaro, A. Speranza, M. G. Daidone, Hypoxia and estrogen receptor profile influence the responsiveness of human breast cancer cells to estradiol and antiestrogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 76–82 (2004).

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1: Effect of long-term chemical hypoxia on ER $\alpha$  expression, proliferation and survival of MCF7. (A)** Western-Blot shows ER $\alpha$  protein expression level after prolonged (one month) exposure to CoCl<sub>2</sub>, in presence or absence of 10nM of E2 for 24h. For proteasome inhibition treatment, cells were subjected for 8h to 2.5 $\mu$ M of MG132. ERK1/2 was used as normalizing control. **(B)** Proliferation count of MCF7 treated for 6 days with EtOH, 10nM E2 or 1 $\mu$ M 4OHT, in presence of 2% of FBS steroid-free. Values are expressed in fold change compared to the number of seeded cells at the beginning of the treatment. **(C)** FACS analysis of the different phases of the cell-cycle after propidium iodide incorporation. MCF7 cells were treated for 48h with EtOH, 10nM E2 or 1 $\mu$ M 4OHT. **(D)** TUNEL assay shows percentage of cell death between control and CoCl<sub>2</sub>-treated cells, in presence or absence of 10nM of E2 for 72h. \**p*-value <0.05, \*\**p*-value <0.01 and \*\*\**p*-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control. #*p*-value <0.05 with a Mann-Whitney test for comparisons against CoCl<sub>2</sub> treatment.

**Figure 2: Transcriptomic analysis of the E2 response under CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxic stress. (A)** Venn diagram represents whole E2-regulated genes in control compared to CoCl<sub>2</sub> treatment, using absolute fold change of 1.8. **(B)** Scatter plot showing for each gene its Log<sub>2</sub> E2 fold of induction in CoCl<sub>2</sub> in function of its fold of induction in control. Trend curve shows that majority of genes display similar FC in the two condition. **(C)** Control and CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells were treated with EtOH or 10nM of E2. Extracted RNAs from four independent biological samples were subjected to microarray analysis. Heatmap shows all genes that are either differentially expressed either by CoCl<sub>2</sub> or E2. Groups were identified using K-Means method. Graphs on the left represent the average of expression value (Log<sub>2</sub>) of all genes of each cluster. The number of genes in each cluster are indicated. **(D)** & **(E)** Distribution of E2 down-regulated (C3/C4) and up-regulated genes (C5/C6/C7)

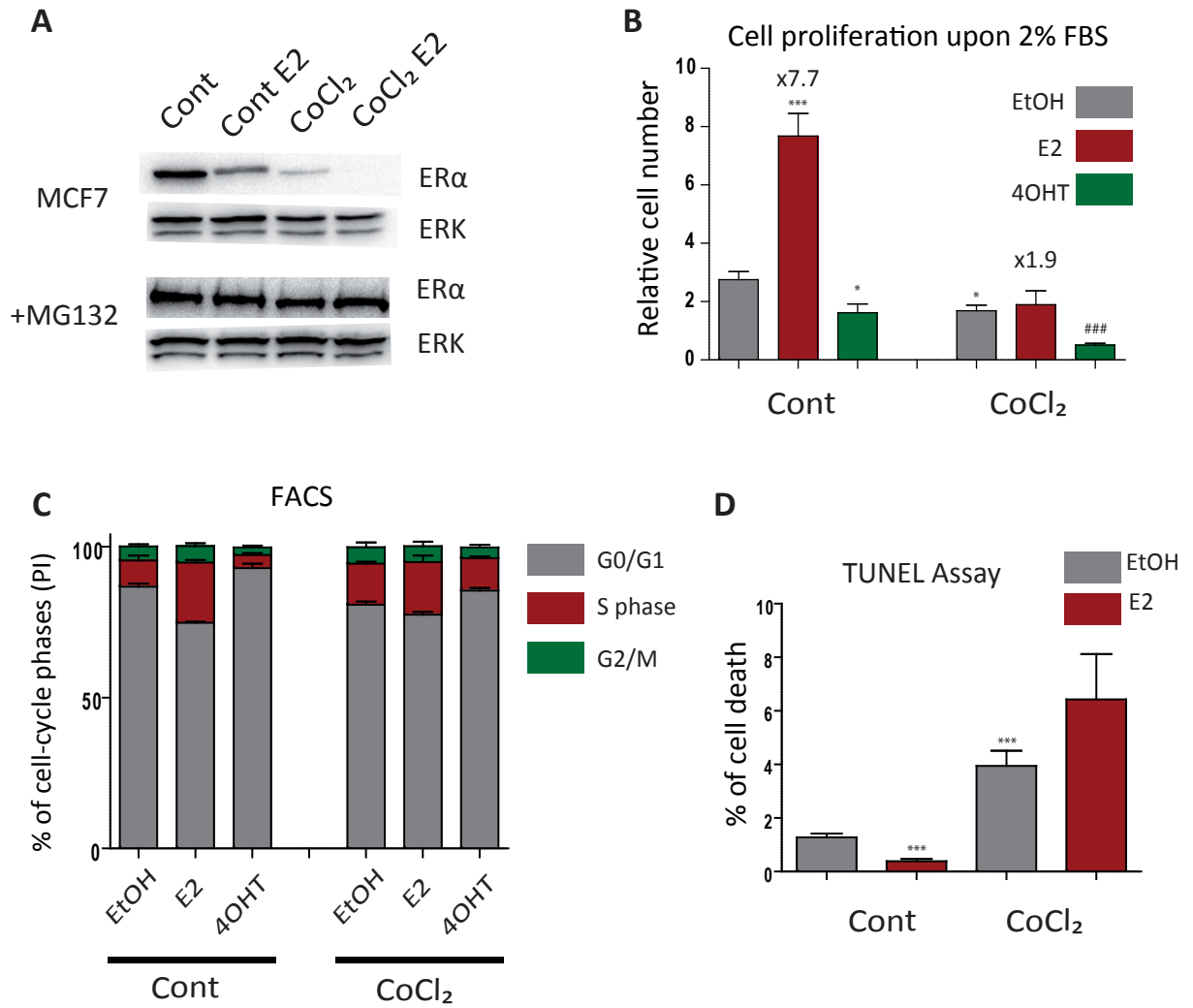
respectively, according to their basal expression level in hypoxia in ascending order. Gray and brown areas indicates genes whose basal expression level is significantly down-regulated and up-regulated respectively by hypoxia with a FC of 1.8 (Log<sub>2</sub> FC = 0.85). **(F)** RT-qPCR experiments of representative genes validating the expression profiles found in cluster C5, C6 and C7. \**p*-value <0.05, \*\**p*-value <0.01 and \*\*\**p*-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control.

**Figure 3: Genome-wide reprogramming of ER $\alpha$  cistrome in CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells. (A) & (B)** Venn diagrams showing the overlaps of genomic regions bound by ER $\alpha$  in control or CoCl<sub>2</sub>-treated MCF7 cells, following a 50 min treatment with E2 or EtOH as vehicle control, as determined from ChIP-seq experiments. The ER $\alpha$  ChIP-seq signals were aligned and averaged within a -2/+2 kbp window centered on ERBS belonging to the 3 categories in the upper Venns. **(C)** Graphs representing the mean of ER $\alpha$  ChIP-seq signal obtained at the center of the conserved ERBSs located at the vicinity of the TSSs of the genes clustered in C5, C6 and C7 by transcriptomic analysis previously defined in figure 2A. **(D)** The stacked histogram illustrates the % and the effectiveness of enrichment in conserved, lost and gained ERBSs in each cluster. **(E)** Heatmaps summarizing data obtained in CHIP-qPCR experiments that evaluate ER $\alpha$  recruitment (red) and H3K27Ac enrichment (blue) on conserved ERBSs at the vicinity of genes belonging the clusters C5, C6 and C7. Data shown are the mean of relative enrichment of five independent experiments normalized to an internal control (FOX20) **(F)** CHIP experiments on CoCl<sub>2</sub>-specific ERBSs directed against ER $\alpha$ , H3K27ac and H3K4me2. Data shown are the mean of relative enrichment of five independent experiments normalized to an internal control (FOX20). \**p*-value <0.05, \*\**p*-value <0.01 and \*\*\**p*-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control. #*p*-value <0.05 with a Mann-Whitney test for comparisons against CoCl<sub>2</sub> treatment.

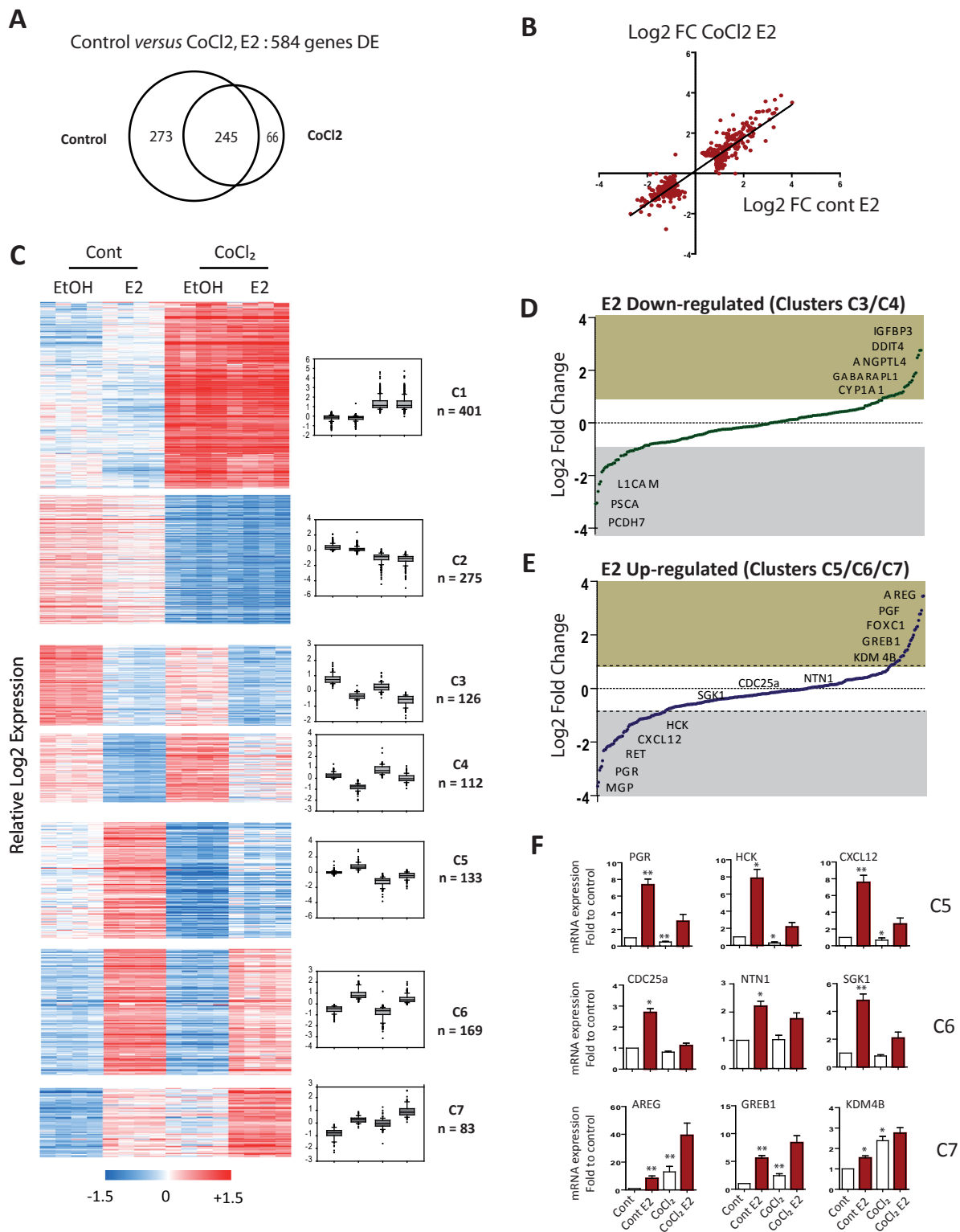
**Figure 4: Hypoxia is reversible in regards of estrogenic sensitivity.** MCF7 were subjected to one month of hypoxic pressure using CoCl<sub>2</sub> containing media followed by one month of recovery in CoCl<sub>2</sub> free media (Rescue). Rescued cells were compared to control MCF7 cells. **(A)** Western blot shows complete recovery of ER $\alpha$  protein expression. ERK was used as normalizing control. **(B)** Proliferation count of MCF7 treated for 6 days with EtOH, 10nM E2 or 1 $\mu$ M 4OHT, in presence of 2% of steroid-free FBS. Values are expressed in fold change compared to the number of seeded cells at the beginning of the treatment. **(C) & (D)** Extracted RNAs from four independent biological samples were subjected to microarray analysis. C, venn diagram represents whole E2-regulated genes in control compared to rescue situation, using an absolute fold change of 1.8. D, Heatmap shows all genes that

are differentially expressed between control and rescued MCF7 cells, in presence or absence of E2. Groups were identified using K-Means method. Graphs on the left represent the average of expression value (Log2) of all genes of each cluster. The number of genes in each cluster are indicated. **(E)** Venn diagrams show ERBSs overlapping in E2 or EtOH-treated cells for 50 minutes, either in control or rescue conditions, as determined from CHIP-seq experiments. The ER $\alpha$  CHIP-seq signals were aligned and averaged within a -2/+2 kbp window centered on ERBS belonging to the 3 categories in the upper Venns. **(F)** Venn diagram shows ERBSs overlapping between control, CoCl<sub>2</sub>-treated and rescued cells. All ERBSs detected in absence or presence of E2 were considered in each condition. \**p*-value <0.05, \*\**p*-value <0.01 and \*\*\**p*-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control. #*p*-value <0.05 with a Mann-Whitney test for comparisons against rescue condition.

**FIGURE 1**

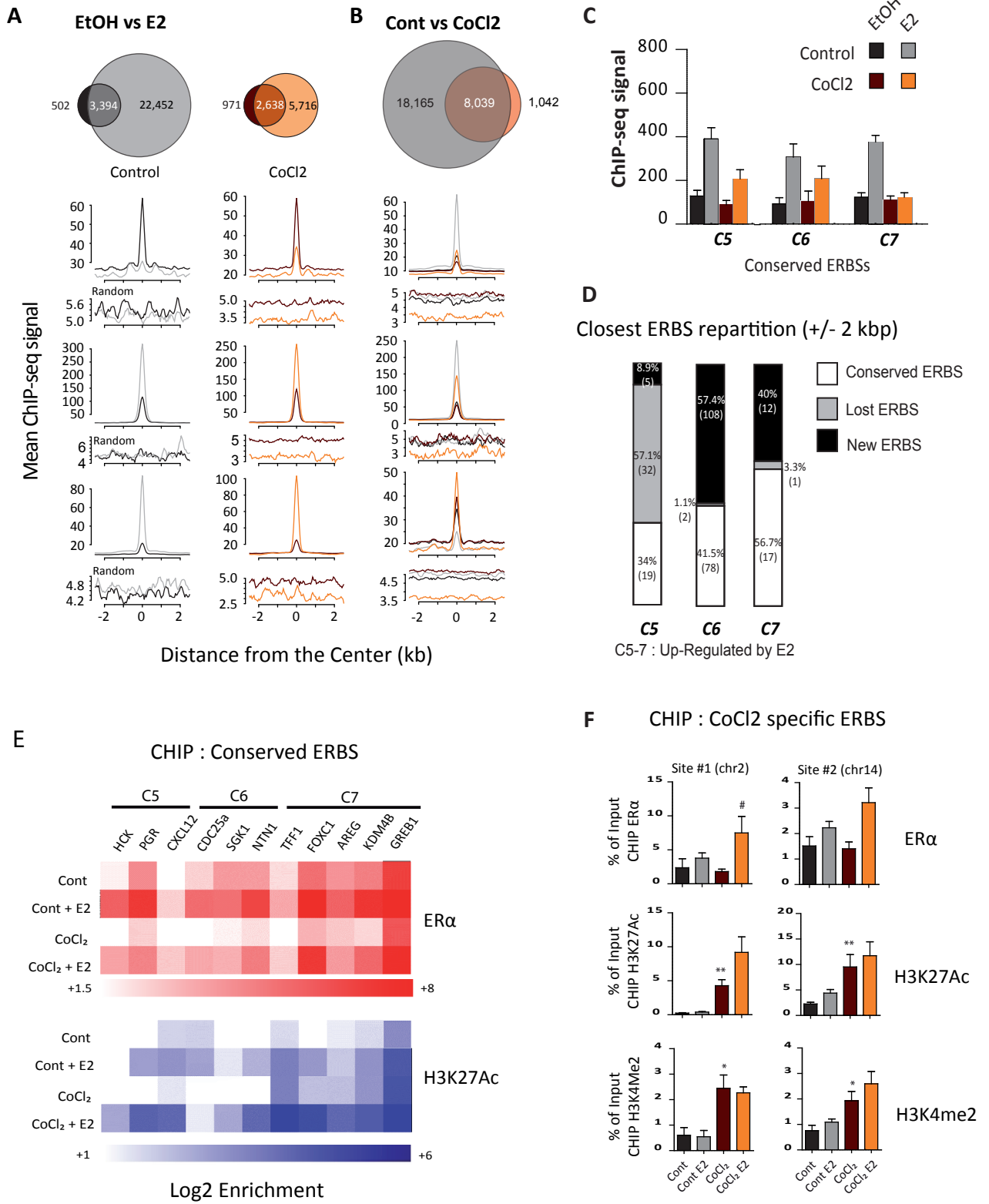


**FIGURE 2**

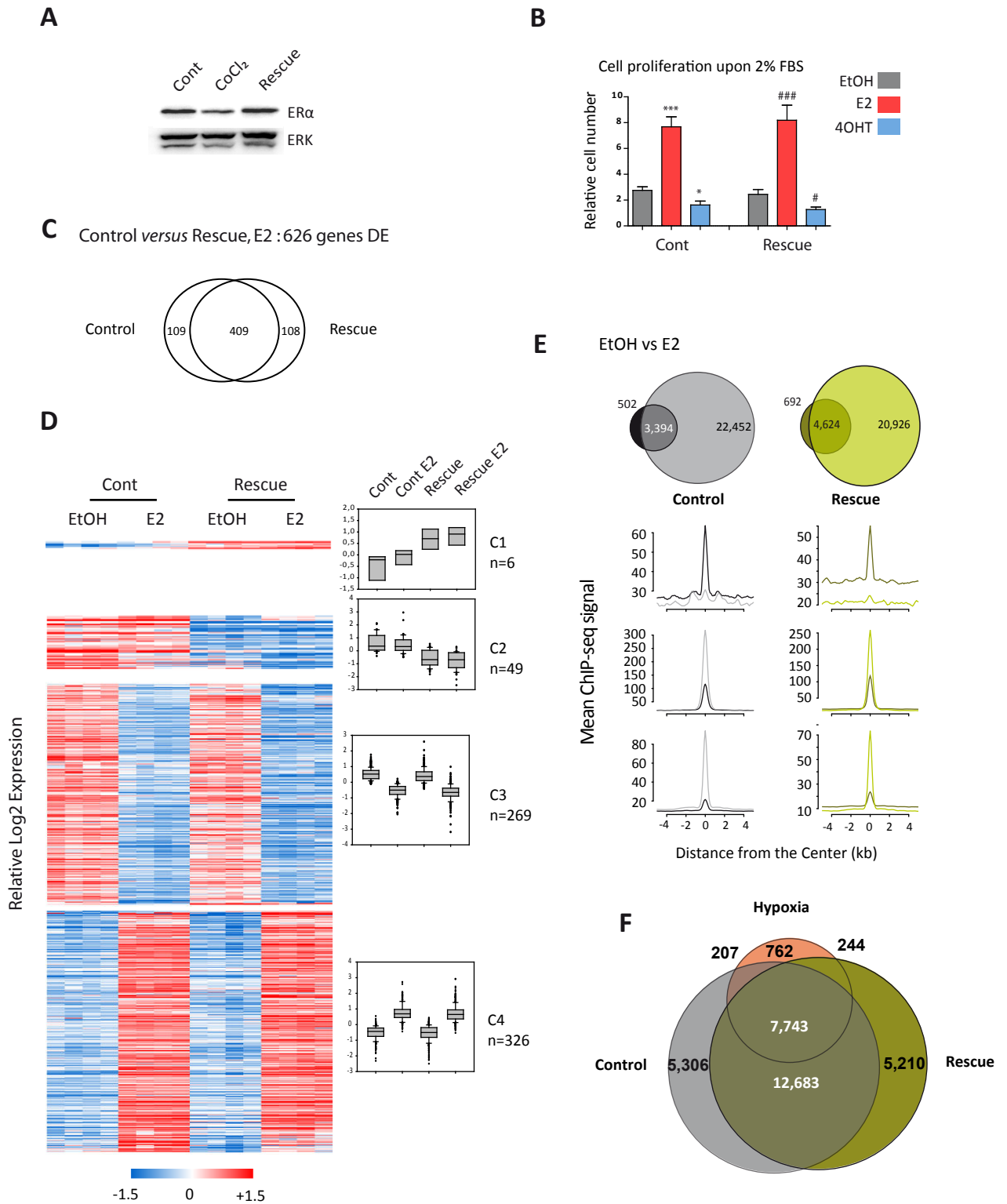


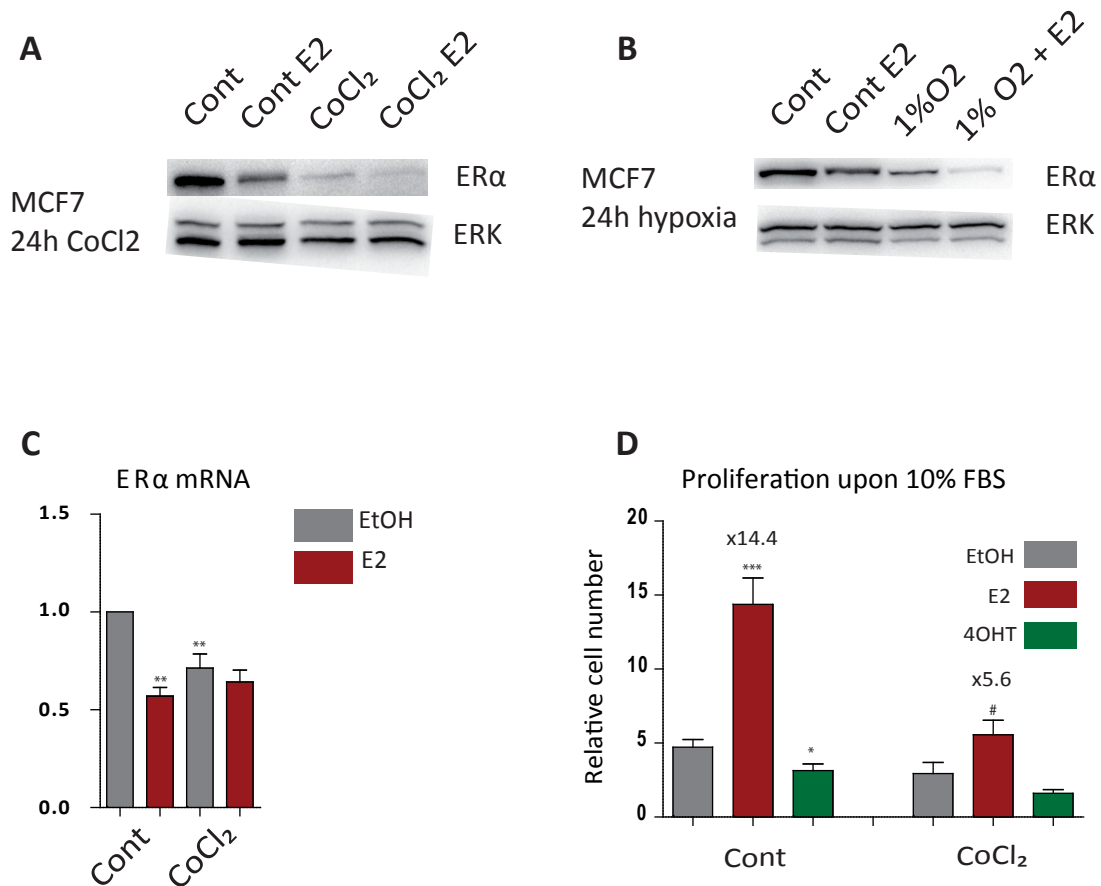


**FIGURE 3**

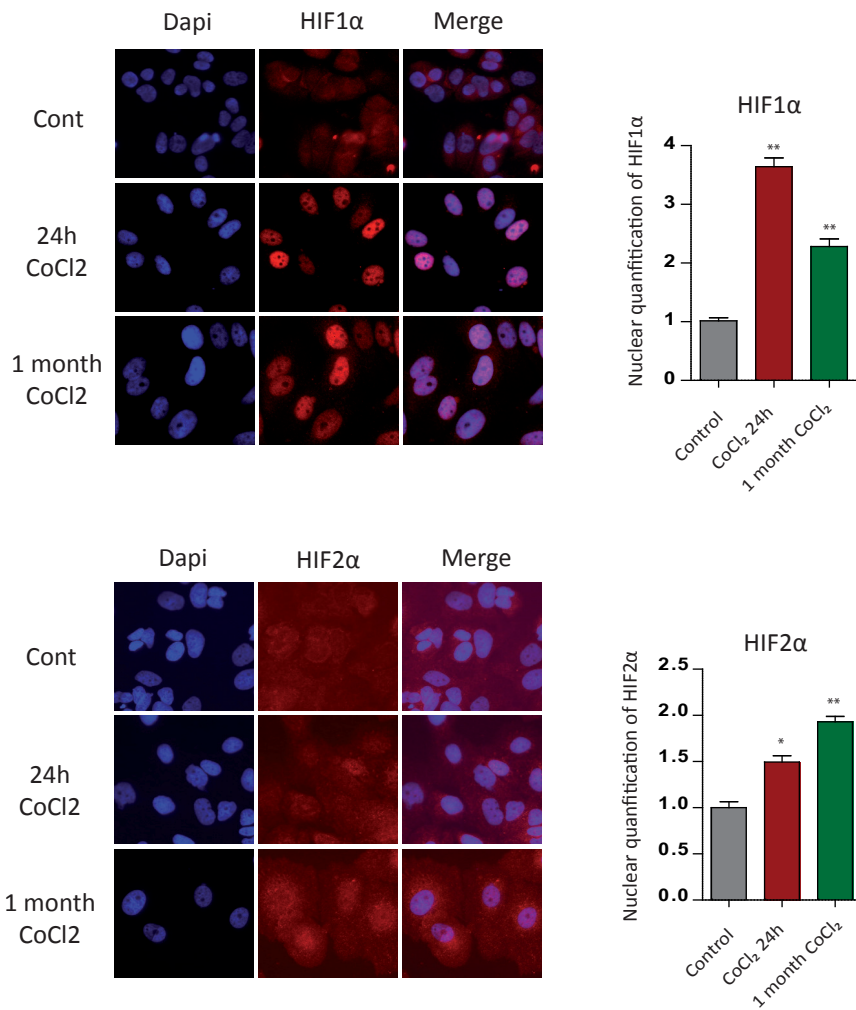


**FIGURE 4**

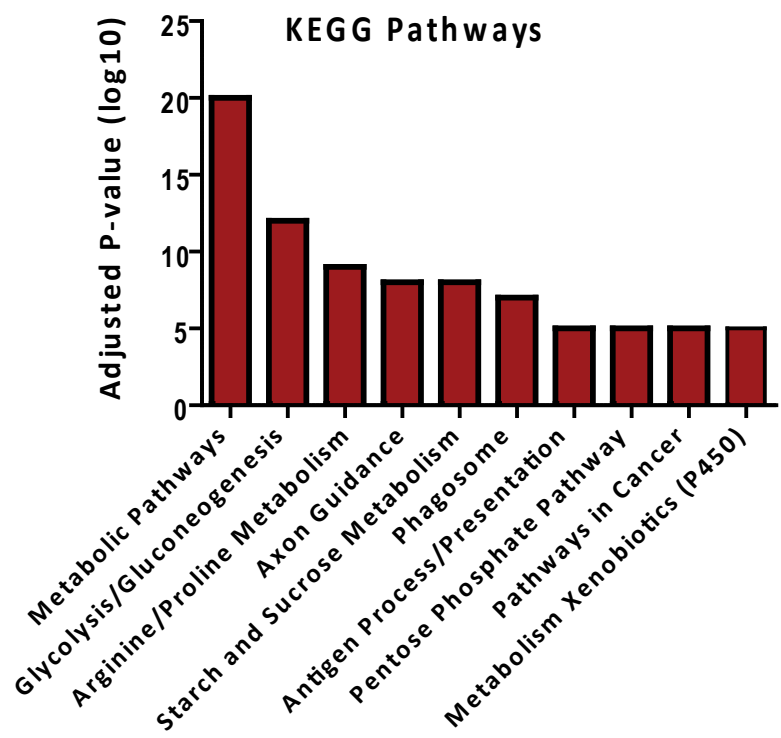




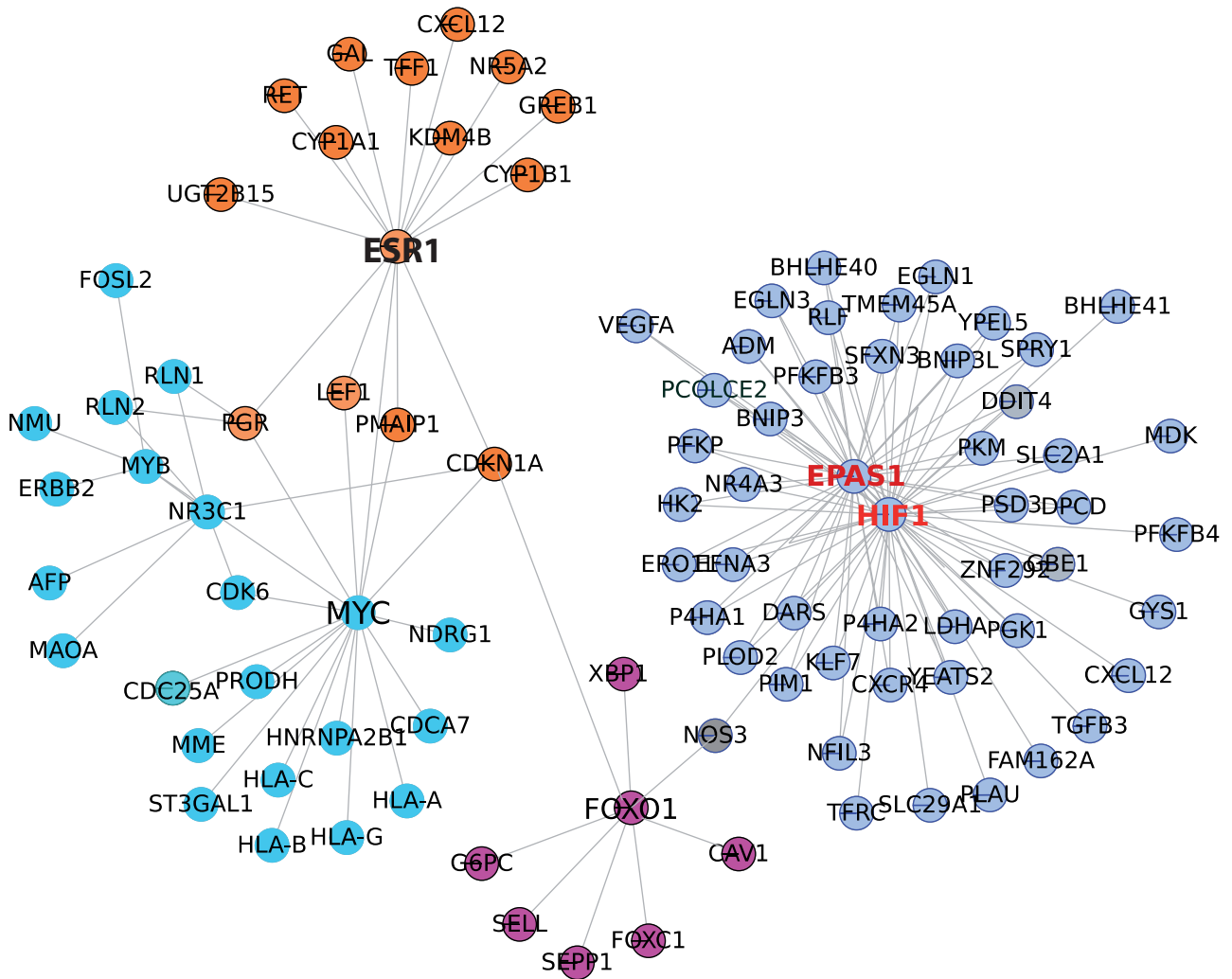
**Supplementary figure 1: Consequences of hypoxia on ERα protein and mRNA expression level and on proliferation of MCF7 cells.** (A) Western-Blot shows ERα protein expression level after 24h of exposure to CoCl<sub>2</sub>, in presence or absence of 10nM of E2 for 24h. (B) Western-Blot shows ERα protein expression level after 24h in presence of 1% O<sub>2</sub> atmosphere using H35 hypoxystation (Don Whitley), in presence or absence of 10nM of E2 for 24h. (C) qPCR shows ERα mRNA expression level after prolonged (one month) exposure to CoCl<sub>2</sub>, in presence or absence of 10nM of E2 for 24h. (D) Proliferation count under 10% FBS steroid free DMEM, of MCF7 treated for 6 days with EtOH or 10nM E2 or 1μM 4OHT. Values are expressed in fold change compared to the number of seeded cells at the beginning of the treatment. \*p-value <0.05, \*\*p-value <0.01 and \*\*\*p-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control. #p-value <0.05 with a Mann-Whitney test for comparisons against CoCl<sub>2</sub> treatment.



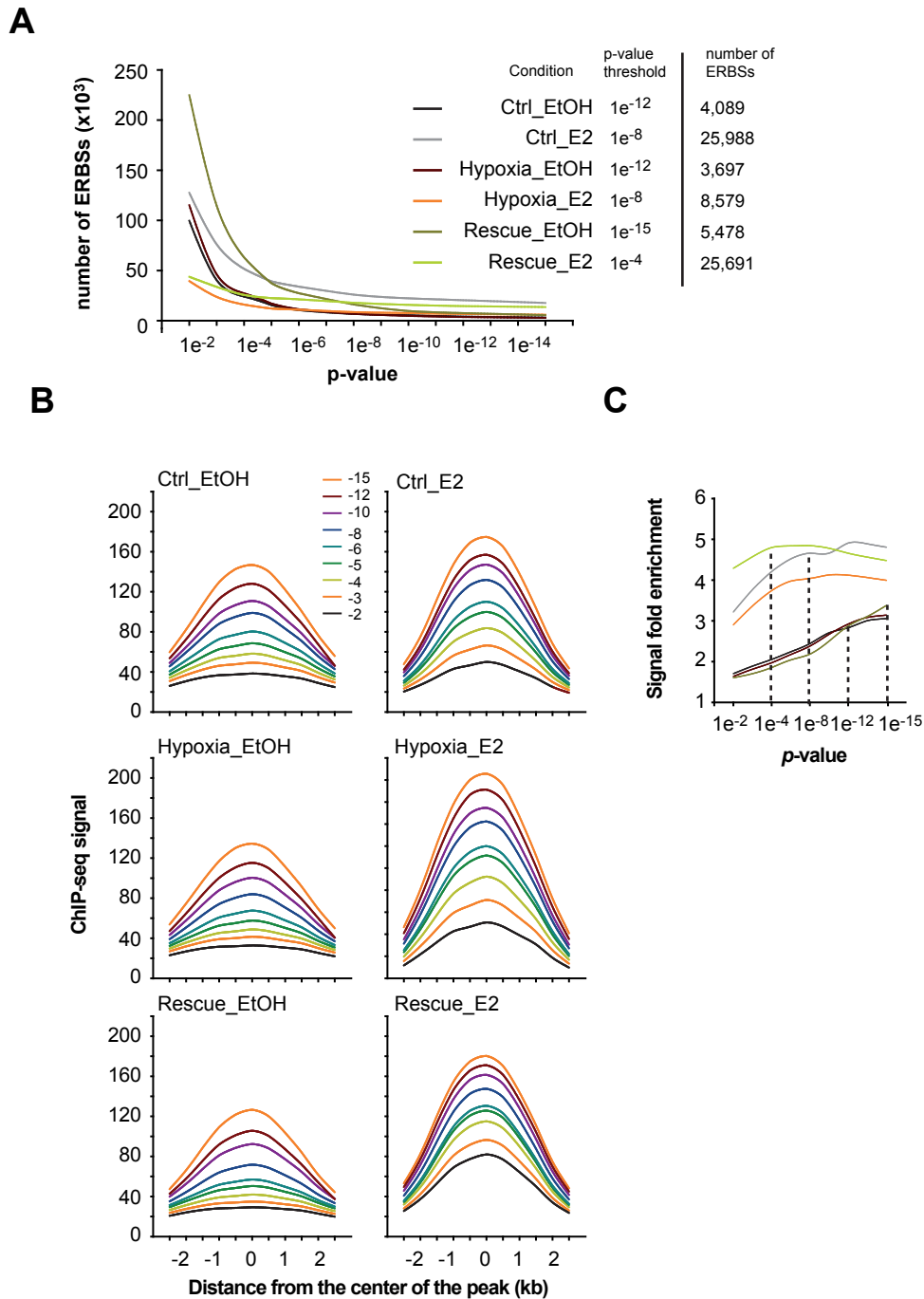
**Supplementary figure 2: HIF1α and HIF2α activation in MCF7 cells after CoCl<sub>2</sub> treatment.** Immunofluorescence experiments showing HIF1α and HIF2α nuclear localization upon CoCl<sub>2</sub> exposure. Nuclear quantification of HIFα was performed in control condition, after 24h or 1 month of CoCl<sub>2</sub> treatment in MCF7 cells. Nuclear HIFα was quantified using Image J software. \*p-value <0.05, \*\*p-value <0.01 and \*\*\*p-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control.



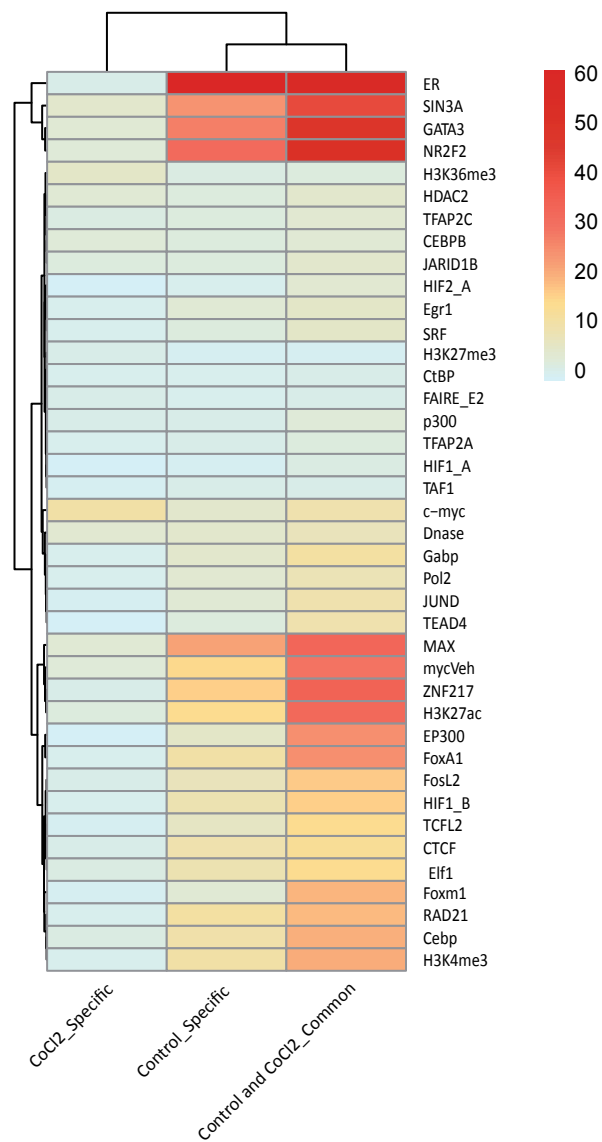
Supplementary figure 3: KEGG pathway analysis performed from the genes that are differentially expressed upon CoCl<sub>2</sub> exposure, using DAVID online software.



**Supplementary figure 4: Transcriptional network built from transcript profiling data.** It was built from differentially expressed genes presented in Heatmap (figure 2B). Network was built using the AMEN software (Chalmel et Primig, 2008). Being not differentially expressed at the mRNA level, HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  were added to network and used as central knots.

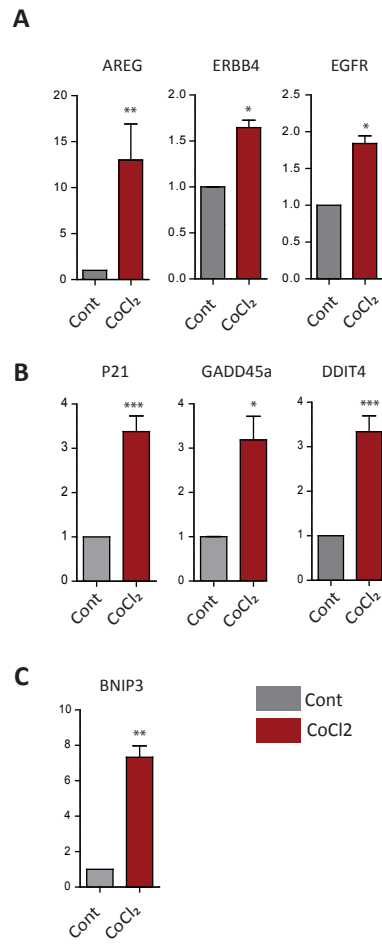


**Supplementary figure 5: Determination of specific ER $\alpha$  cistromes. (A)** We identified ER $\alpha$  enriched regions (ERBSs) in MCF-7 cells treated or not with E2 for 50 min in presence or absence hypoxia mimetic agent CoCl<sub>2</sub>, using different thresholds of significance and peaks defined as being constituted of at least 4 adjacent signals within 65 bp above the threshold values. The number of ERBSs identified is shown here as a function of the p-value used. The table on the right side of the panel indicates the number of ERBSs at the chosen p-value found to have to best signal to noise ratio (read the following legend). **(B)** Each graph represents the mean ChIP-seq signal observed on the different sets of ERBSs determined in Panel A in a -2.5/+2.5 kb window centered at each ERBS summit. **(C)** The mean signal determined on all sets of ERBSs identified at each p-values was normalized to background signals measured at -5kb from the center of each ERBS. These normalized values indicate the mean fold enrichment of identified ERBSs in ER $\alpha$ . We determined the best p-value threshold indicated in Panel A for discriminating the signal-to-noise within ERBSs as the one determining the plateau of these curves, as illustrated by the dotted line.



**Supplementary figure 6: Hierarchical clustering of the percentage of overlap of ER $\alpha$  cistromes in control and CoCl<sub>2</sub> treated cells with the binding sites of other transcription factors or enriched regions of histones marks previously determined in MCF7 cells.** Analysis was made on CoCl<sub>2</sub> specific ERBSs, control specific ERBSs and common ERBSs. References of published CHIP-Seq data are listed in supplementary table 3.





**Supplementary figure 7: Transcriptome analysis reveals CoCl<sub>2</sub>-dependent upregulation of several genes related with endocrine resistance, cell-cycle and cell-growth arrest and apoptosis.**

RT-qPCR experiments were performed against genes related with (A) endocrine resistance (AREG, ERBB4, EGFR), (B) in cell-cycle and cell-growth arrest (P21, GADD45a, DDIT4) (C) and in apoptosis (BNIP3). \*p-value <0.05, \*\*p-value <0.01 and \*\*\*p-value <0.001 with a Mann-Whitney test for comparisons against the control.

<b>RT-qPCR</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
SGK1	GACAGGACTGTGGACTGGTG	TTTCAGCTGTGTTTCGGCTA
AREG	GTATTTTCACTTTCCGTCTTG	CCTGGGTATATTGTGCGATTCA
CXCL12	CTCCTGGGGATGTGTAATGG	GCCTCCATGGCATACATAGG
TFF1	ACCATGGAGAACAAGGTGA	CCGAGCTCTGGGACTAATCA
PGR	GTGCCTATCCTGCCTCTCAATC	CCCCCCGTCGTAACITTCG
GREB1	GAGGATGTGGAGTGGAGACC	CAGTACCTCAAAGACCTCGGC
TBP	AGGCAAGGGTACATGAGAGCCA	TGGCTCTCATGTACCCTTGCT
DDIT4	AGGAAGCTCATTGAGTTGTG	GGTACATGCTACACACACAT
ER $\alpha$	AGTACAATGAACCTGCAAGC	GGCCAGGTCATTCTCCACATT
HCK	CTGCCAACATCTTGGTCTCT	TCAGCAGGATACCAAAGGAC
CDC25a	CAAACCTTGACAACCGATGC	ACACTGACCGAGTGCTGGAG
p21	TGTGGACCTGTCACTGTCTTG	TAGGGCTTCCTCTTGAGAA
KDM4b	GACATCAGCGGCTCTTTGTATGATG	ATGCCGAAGTACAGGTAGGGCGTG
BNIP3	CAGGGCTCCTGGGTAGAACT	CTACTCCGTCCAGACTCATGC
EGFR	GTGACCGTTTGGGAGTTGATGA	GGCTGACGGAGGCGTTCTC
<b>CHIP-qPCR</b>		
FOXCl	GCTGGTGGCACTCAGAAAGT	CCCTCCTTTGACAGGAAGAA
AREG	AGCTAGAAGCGTTTGACAGGA	TGGGTGTGTGTTTGTCCACT
CXCL12 ERE1	TGCTCCGCTAAGGTTTCAGT	GCACCTAGTCACACCCACCT
NTN1	GAACAAGGATGGAGGGTGAA	CCCCTCTACAAGGCAAGATG
GREB1	GCACACTTCCACCTCTGCT	GCTCGCTTGCAAAGTCAAAT
TFF1	GTGCACTTCTCGAAGGTCT	CAGGTAAGGCGTGCTTCTTC
FOX20 (internal control)	TTTGCTTTATTTGGCGCTTT	TGAGCGATTGCAAAGAGATG
HCK	GTAGGTGCCTGTGACCCTGT	TACTTCAGCCTCTGGCTGGT
KDM4B	TCTGATTGGACACCTGGCAG	GCTTCCACCAAAAACAGCCTG
CDC25a	AGGCCTGAGAGATGGGAAGA	ACGGGTCATGCTGTTGTCTC
PGR	GCAGGACGACTTCTCAGACC	GCCTGACCTGTTGCTTCAAT
SGK1	GTTCTGTCCCCATTGAGAGG	GGAGCCGATGGAGACTGATA
CoCl2 specific ERBS1	GGCTATCTTGACAGCGGGTC	TGGCAGGAAGCGAATTAGTCA
CoCl2 specific ERBS2	CCTCCGCCCTATGGGAAAAA	ATGTCGCTATGTGTTCTGGGA

**Supplementary Table 1: List of primers used in qPCR to quantify mRNA expression and CHIP**

<b>Sample</b>	<b>Type</b>	<b>Raw reads</b>	<b>Aligned reads</b>	<b>Unique positions</b>	<b>Normalization coefficient</b>
<b>MCF7 Control EtOH</b>	Input	136,024,634	107,011,244	93,736,338	NA
<b>MCF7 Control E2</b>	Input	114,985,595	91,151,438	80,379,555	NA
<b>MCF7 Hypoxia EtOH</b>	Input	126,035,952	96,026,526	83,989,729	NA
<b>MCF7 Hypoxia E2</b>	Input	127,009,747	92,622,859	81,203,292	NA
<b>MCF7 Rescue EtOH</b>	Input	101,653,620	75,140,544	66,405,889	NA
<b>MCF7 Rescue E2</b>	Input	108,506,834	85,577,616	76,349,649	NA
<b>MCF7 Control EtOH</b>	ChIP ER	103,630,263	75,206,331	52,480,373	1.65
<b>MCF7 Control E2</b>	ChIP ER	156,709,777	123,215,788	83,214,383	1
<b>MCF7 Hypoxia EtOH</b>	ChIP ER	121,701,565	90,327,227	62,349,497	1.37
<b>MCF7 Hypoxia E2</b>	ChIP ER	90,330,137	62,648,747	39,791,861	1.98
<b>MCF7 Rescue EtOH</b>	ChIP ER	153,687,583	122,234,881	89,295,787	1.01
<b>MCF7 Rescue E2</b>	ChIP ER	119,442,446	90,309,476	65,287,259	1.36

**Supplementary Table 2. ChIP-sequencing statistics.**

**Transcription Factors**

<b>Cell line</b>	<b>Target</b>	<b>(Dataset)</b>	<b>Reference</b>
	ESR1	/	Odom et al, 2010
	FoxA1_1	6566	Hurtado A, et al. Nat. Genet. 2011
	FoxA1_2	6567	Hurtado A, et al. Nat. Genet. 2011
	Dnase_1	45031	Maurano MT, et al. Science 2012
	Dnase_2	45032	Maurano MT, et al. Science 2012
	MAX	46324	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	GABPA	46314	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	REST	46313	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	SRF	46312	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	TAF1	46320	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	H3K4me3	UCSC dataset	Encode data
	H3K27ac	UCSC dataset	Encode data
	H3K27me3	UCSC dataset	Encode data
	H3K36me3	UCSC dataset	Encode data
	SIN3A	UCSC dataset	Encode data
	RAD21	UCSC dataset	Encode data
<b>MCF-7</b>	PML	UCSC dataset	Encode data
	EP300	UCSC dataset	Encode data
	MAX	UCSC dataset	Encode data
	JUND	UCSC dataset	Encode data
	HDAC2	UCSC dataset	Encode data
	GATA3	UCSC dataset	Encode data
	Gabp	UCSC dataset	Encode data
	Foxm1	UCSC dataset	Encode data
	FosL2	UCSC dataset	Encode data
	Elf1	UCSC dataset	Encode data
	Egr1	UCSC dataset	Encode data
	Cebp	UCSC dataset	Encode data
	ZNF217	UCSC dataset	Encode data
	TCFL2	UCSC dataset	Encode data
	CTCF	UCSC dataset	Encode data
	TEAD4	UCSC dataset	Encode data

**Supplementary Table S3. Public dataset used.**



# **ARTICLE N°2**



**Artificially induced transition from luminal to basal-like phenotype of breast cancer cells engages a shift from genomic to non-genomic activities of ER $\alpha$  activity**

Tamara Fernandez-Calero<sup>1§</sup>, Charly Jehanno<sup>2§</sup>, Denis Habauzit<sup>2</sup>, Stephane Avner<sup>3</sup>, Frederic Percevault<sup>2</sup>, Nouredine Boujrad<sup>2</sup>, Pascale Le Goff<sup>2</sup>, Monica Marin<sup>1</sup>, Denis Michel<sup>2</sup>, Raphaël Métivier<sup>3</sup> and Gilles Flouriot<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Biochemistry-Molecular Biology, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo 11400, Uruguay.

<sup>2</sup> Université de Rennes 1, Institut de Recherche en Santé Environnement et Travail, INSERM U1085, Equipe TREC, Rennes, France

<sup>3</sup> Université de Rennes 1, Institut de Génétique et Développement de Rennes, UMR 6290 CNRS, Equipe SP@RTE, Rennes, France

<sup>§</sup> Contributed equally to the work.

**\*Corresponding author:**

Dr. Gilles Flouriot

INSERM U1085, IRSET, University of Rennes 1, Beaulieu Campus, 35042 Rennes cedex, France.

Phone: +33-2 23 23 68 04

Fax: +33-2 23 23 67 94

E-mail: [gilles.flouriot@univ-rennes1.fr](mailto:gilles.flouriot@univ-rennes1.fr)



## Abstract

Estrogen receptor (ER $\alpha$ ) is central in driving the development of hormone-dependent breast cancers. A major challenge in treating these cancers is to understand and struggle endocrine resistance. We have previously shown that the Megakaryoblastic Leukemia 1 (MKL1) protein, a master regulator of actin dynamic and cellular motile functions, directs down-regulation of ER $\alpha$  and hormonal escape of estrogen-responsive breast cancer cell lines. In the present study, we decipher the underlining mechanisms by tracking functional changes in ER $\alpha$  activity. We demonstrate through gene expression microarray analysis that the constitutive activation of MKL1 in ER $\alpha$ -positive MCF7 breast cancer cells induces a transition from a luminal to a basal-like phenotype and suppresses almost all regulations of gene expression by estrogen. Chromatin immunoprecipitation of DNA coupled to high-throughput sequencing (ChIP-Seq) shows a profound reprogramming in ER $\alpha$  cistrome associated with a massive loss of ER $\alpha$  binding sites (ERBSs) generally associated with lower ER $\alpha$ -binding activity. Novel ERBSs appear to be associated with EGF and RAS signaling pathways. ER $\alpha$  dynamic was further impacted by a displacement of its monomer/dimer equilibrium towards its monomer state, associated with a redistribution of the normally nuclear ER $\alpha$  protein to the entire cell volume. We next show that the combination of these remodeled dynamics of ER $\alpha$  alters its interactions with genomic and non-genomic partners. In particular, the formation of ER $\alpha$ /kinase complexes was promoted by the constitutive activation of MKL1. Hence, MKL1-induced transition of ER-positive breast cancer cells from luminal to basal-like phenotype shifts ER $\alpha$  activities from genomic to non-genomic function.

## Introduction

Breast cancer exhibits strong heterogeneity from genetic and phenotypic features to clinical behavior<sup>1</sup>. Based on global gene expression profiles, at least four major molecular subtypes have been identified, including luminal A, luminal B, HER2-enriched and basal-like tumor<sup>2,3</sup>. Estrogen receptor-alpha (ER $\alpha$ ) expression defines the luminal subtypes. More than two-thirds of breast cancers overexpress ER $\alpha$  allowing most of them to depend on estrogen to proliferate<sup>4,5</sup>. This specificity makes ER $\alpha$  an ideal target for endocrine therapies that use selective estrogen receptor modulators (SERM) such as tamoxifen and/or aromatase inhibitors to block estrogen-dependent cell proliferation<sup>6,7</sup>. Unfortunately, a significant number of ER $\alpha$  positive breast tumors fail to initially respond to endocrine therapy and most tumors that are initially responding, stop benefiting from such treatments and acquire resistance<sup>8,9</sup>. Endocrine resistance in that case often relies on changes in the functional properties of ER $\alpha$  allowing an adaptation from ligand-dependent to ligand-independent activity of ER $\alpha$ <sup>9</sup>. Actually, luminal A breast cancers generally express higher level of ER $\alpha$ , exhibit better response to endocrine therapy and have better prognosis than luminal B subtype<sup>10,11</sup>. These last years, estrogen signaling in luminal breast cancer cells was characterized through gene expression and genome-wide chromatin binding profiling using both cell lines and human tumors<sup>12-14</sup>. Data highlighted that ER $\alpha$  binds to several thousand of sites across the genome and that most of these sites are located far away from the promoter regions. The genomic regions bound by ER $\alpha$  are enriched with cis-regulatory elements bound by pioneer factors, notably FOXA1 and GATA3 whose expression is correlated with luminal subtype<sup>15</sup>. These pioneer factors promote ER $\alpha$  accessibility to chromatin and long-range chromatin interactions between ER $\alpha$  bound enhancers and the promoter regions of target genes or between enhancers.

ER $\alpha$  binding to chromatin still occurs in breast cancer cell lines and tumors that are resistant to antiestrogen therapies<sup>14</sup>. However, these cells do present a modified cistrome of ER $\alpha$ , having lost number of ER $\alpha$  binding sites (ERBS) but also harboring specific ones. Interestingly, these novel ERBSs found in antiestrogen-resistant cells are still bound by FOXA1 but are depleted in GATA3 motifs. In addition, the ER $\alpha$  cistrome in drug resistant cell lines and tumors is characterized by an increased average ER $\alpha$  binding signal intensity likely resulting from a constitutively active estrogen receptor. However, the transcriptomic signature of these cells remain associated with ER $\alpha$ -positive luminal subtype<sup>14</sup>. More aggressive in nature with higher proliferation and metastasis potential than luminal subtypes, basal-like tumors often have a triple ER $\alpha$ /progesterone receptor (PR)/HER2 negative phenotype<sup>2,16</sup>. Consequently, these tumors are not amenable to conventional targeted therapies. Recent studies suggest that basal-like breast cancers originate from luminal cells rather than a

mammary stem cell (MaSC) <sup>1,17,18</sup>. This implies that their oncogenic progression involves an initial dedifferentiation process to basal-like phenotype, which can be assimilated to an epithelial-mesenchymal transition (EMT) <sup>1</sup>. This transition to basal-like phenotype was demonstrated by targeting ER $\alpha$ -negative luminal progenitors <sup>18</sup>. However, such a phenomenon might be also envisioned from ER $\alpha$ -positive luminal cells. Indeed, increasing evidence shows that, although a large fraction of luminal progenitors is ER $\alpha$ -negative, a minor proportion expresses also ER $\alpha$  <sup>19</sup>. Furthermore, up to 30% of initially ER $\alpha$ -positive tumors that have developed resistance to antiestrogen therapies lose ER $\alpha$  expression <sup>20</sup>. Therefore, endocrine resistance may also rely on a dedifferentiation process from luminal to basal-like phenotype. To date, no clear information exists on the functional changes in ER $\alpha$  activity during this transition to an ER $\alpha$ -independent cell fate phenotype, associated or not with a total loss of ER $\alpha$  expression.

MKL1 is a member of the myocardin-related transcription factor (MRTF) family, whose members are coactivator of the serum response factor (SRF) <sup>21,22</sup>. Its main role is to sense the degree of actin polymerization and to subsequently integrate this information at the gene expression level. More precisely, MKL1 is sequestered in an inactive form in the cytoplasm by free actin monomers. Upon actin polymerization, MKL1 is activated and translocates into the nucleus where it competes with the ternary complex factor ELK1 for SRF binding to promote the induction SRF target genes involved in motile or contractile cell functions to the detriment of those involved in cell growth <sup>21</sup>. Consequently, MKL1 exerts important functions in vascular smooth muscle cell and cardiac myocyte differentiation, neuronal migration or tumorigenesis <sup>22</sup>. Interestingly, MKL1 and SRF are required for tumor cell invasion and metastasis <sup>23</sup>. Recent genome-wide association studies have identified MKL1 locus as a susceptible risk factor for breast cancer and especially triple-negative breast cancer <sup>24-26</sup>. Likewise, we previously showed that the nuclear localizations of ER $\alpha$  and MKL1 in breast cancer cells are mutually exclusive <sup>27</sup>. MKL1 signaling pathway is indeed active in breast cancer cell lines with a basal-like phenotype and is on the contrary silenced in luminal ER $\alpha$ -positive cell lines. We further demonstrated that the activation of MKL1 in estrogen sensitive breast cancer cells lead to an hormonal resistance associated with a sharp drop in the expression level of ER $\alpha$ , PR and HER2, which recalls the establishment of a triple negative phenotype <sup>27</sup>. In the present study, using genome wide analysis of gene expression and ER $\alpha$  chromatin binding, we confirm that initially ER $\alpha$ -positive breast cancer cells initiate a transition from luminal to basal-like phenotype upon the expression of a constitutively active form of MKL1. This model thereby allowed us to track the functional changes in ER $\alpha$  activity engaged during such a dedifferentiation process.

## Materials and methods

### *Cell culture*

Stably transfected MCF7 T-Rex sub-clones (T-Rex system, Invitrogen), MCF7-control and MCF7-MKL1 $\Delta$ N200, were previously described<sup>27,28</sup>. Cells were routinely maintained in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biowest) and antibiotics (Invitrogen) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Before any experiments, MCF7 cells were grown in phenol red-free DMEM (Invitrogen) containing 2.5% charcoal-stripped FCS (Biowest) for at least 72 hours. In order to induce the expression of the constitutively active mutant of MKL1 (MKL1 $\Delta$ N200), cells were treated the last 48 hours with 1  $\mu$ g/mL tetracycline. 17 $\beta$ -estradiol (E2, Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 10 nM.

### *Protein extraction and Western blotting*

Whole-cell extracts were directly prepared in 3X Laemmli buffer. Following sonication, the protein extracts were denatured for 5 min at 95°C, separated on 10 % SDS polyacrylamide gels, and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). The proteins were then probed with specific antibodies. Antibodies used were against phospho ERK (pERK) (sc-sc-7383, Santa Cruz Biotechnology), ERK1 (sc-94, Santa Cruz Biotechnology), phospho AKT (pAKT) (CS4060, Cell Signaling) and AKT (CS9272, Cell Signaling). An enhanced chemiluminescence system (Immune-Star, Bio-Rad) was used to detect immunocomplexes.

### *Immunofluorescence*

Cells were grown on 10 mm-diameter coverslips in 24-well plates. After treatment, cells were fixed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 4% paraformaldehyde (PAF) for 10 min and then permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min. Incubation with the primary antibody (1/1000) was performed overnight (ON) at 4°C. Primary antibodies against N-cadherin (N19, sc-1502), P-cadherin (H105, sc-7893), cytokeratin 14 (LL02, sc-58724), cytokeratin 18 (C-04, sc-51582), ER $\alpha$  (HC-20, sc-543), GATA3 (sc-22206), HER1 (1005, sc-03), phospho Serine 10 histone H3 (pS10H3) (sc-8656), MSK1 (H65, sc-25417) and c-src (B-12, sc-8056) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Antibodies directed against anti-E-cadherin (ab15148), alpha smooth muscle actin (ab5694), PI3kinase P85 alpha (ab22653), MKL1 (ab14984), SRC1 (ab84), SRC3 (ab2782), FOXC1 (ab5079), FOXA1 (ab23738), HER2 (ab16901) and HSP70 (ab2287) were obtained from Abcam. Anti-vimentin (clone V9) antibody was purchased from Sigma-Aldrich. Dye-conjugated secondary antibodies (abcam) were incubated 1h at room temperature. The cover slides were mounted in Duolink II mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich), images were obtained with an ApoTome Axio

Z1 Imager microscope (Zeiss) and processed with Axio Vision Software. Fluorescence was quantified with ImageJ software from images obtained with identical exposure times. Immunofluorescence was scored for at least 20 cells per image on n images obtained from diverse experiments. The means obtained for every image were then averaged.

### ***Proximity Ligation Assay***

The proximity Ligation Assay (PLA) (Duolink, Sigma-Aldrich) was used to detect ER $\alpha$  interaction with different partners and ER $\alpha$  homodimers, according to manufacturer's instructions. Briefly, to measure ER $\alpha$  interaction with a given partner, MCF7 cells were plated, fixed and incubated with the corresponding primary antibodies as previously described in the immunofluorescence section. After washing, cells were incubated 1 hour at 37°C in a humidity chamber with PLA MINUS and PLUS probes conjugated with complementary oligonucleotides, followed by a ligation step of the oligonucleotides during 30 min and a rolling-circle amplification (RCA) reaction using the ligated circle as a template, in which fluorescently labeled oligonucleotides were hybridized to the RCA product. The cover slides were mounted in Duolink II mounting medium with DAPI (Sigma-Aldrich). The images were obtained with an ApoTome Axio Z1 Imager microscope (Zeiss) and processed with Axio Vision Software. PLA dots were analyzed using ImageJ software. For the detection of ER $\alpha$  homodimers, we directly conjugated the PLA oligonucleotides MINUS and PLUS to an ER $\alpha$  monoclonal antibody (sp1, ab27595) using the Duolink *in situ* probemaker kits. The monoclonal antibody was previously purified through protein A affinity and concentrated using a centrifugal filter concentrator. Through this process, MINUS and PLUS conjugated ER $\alpha$  antibodies recognize the same epitope, and the RCA can only take place if ER $\alpha$  is under a homodimer form. Red dots were scored for at least 20 cells by image on n images obtained from diverse experiments. The means obtained for every image were then averaged.

### ***Saturation ligand binding assays***

Whole cell extracts were obtained by thawing-freezing cycles of MCF7 cells in WCE buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM KCl, 2 mM dithiothreitol and 20% glycerol). Tritium radiolabeled estradiol binding studies were performed at 4 °C on 30  $\mu$ g of whole cell extracts using up to 12.5 nM of  $^3$ H-estradiol ( $^3$ H-E $_2$ ). Nonspecific binding was determined in the presence of 150-fold excess of unlabelled ligand. After overnight incubation at 4°C, the assays were stopped by filtration through Whatman GF/C and washed with 10 ml ice-cold PBS. The radioactivity trapped on the filters was determined by liquid scintillation counting at 30% efficiency. Saturation isotherms for  $^3$ H-estradiol binding and Scatchard analysis were performed on three independent experiments.

### ***RNA extraction and gene expression array***

RNA purifications were performed immediately after a treatment of MCF7 cells with 10 nM E2 or ethanol (vehicle control) for 4h. RNAs were extracted with the RNeasy kit (Quiagen) and the quantity and quality of RNAs were assessed using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Nanodrop technology) and an Agilent Bioanalyser. RNAs were then reverse-transcribed and the obtained cDNA were amplified and Cy3-labelled according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies). Gene expression profiling was carried out on Agilent Whole Human Genome 8x60K Microarrays (Agilent Technologies) at the Biosit Rennes facility. Four independent RNA samples per condition (n=4) were randomly examined. Data analysis was performed using 'R' (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), mainly through packages included in the Bioconductor suite<sup>29</sup>. Probes were filtered considering saturation, signal above background and uniformity. Only those with no replicate flagged in at least one condition were taken into account for data analysis. Samples were normalized using 75-percentile shift normalization. Gene expression values were computed as the median intensity values of all filtered probes design for each particular gene. Differential expression was assayed using the limma software package<sup>30</sup>. When we compared MCF7-MKL1ΔN200 and MCF7-control cells, genes were considered differentially expressed when the multiple testing adjusted *P*-value was <0.01 and the absolute value of fold change greater than 4. When we analyzed E2 transcriptional regulation, genes were considered differentially expressed when the multiple testing adjusted *P*-value was <0.05 and the absolute value of fold change greater than 1.8. Gene Ontology analysis and Kegg pathways enrichment analysis were conducted with clusterProfiler<sup>31</sup>. Up-regulated and down-regulated genes were used independently in these analyses.

### ***Chromatin immunoprecipitation (ChIP)***

MCF7 cells were treated with 10 nM E2 or ethanol (vehicle control) during 50 min, washed twice with PBS and cross-linked for 10 min with 1.5% formaldehyde (Sigma). The cross-link reaction was stopped with 0.125 M glycine for 1 min and cells were washed twice with PBS, scraped into 500 μl PBS with protease inhibitors (Complete Inhibitors, Roche), spun 2 min at 3000 g and snap frozen to -80°C. After cell lysis in 300 μl of lysis buffer [10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 0.5% Empigen BB detergent], ChIP was performed as previously described<sup>32,33</sup>. Antibodies against ERα (HC-20, sc-543, Santa Cruz Biotechnology), H3K27ac (ab4729, Abcam) and H3K4me2 (07-030, Merk Millipore) were used in this assay. DNA was purified on NucleoSpin columns (Macherey-nagel) using NTB buffer. ChIP experiments were performed from at least five biological independent replicates. Primers for real-time PCR are provided in Supplementary Materials ([Supplementary Table 1](#)).

### ***ChIP-sequencing (ChIP-seq) and ChIP-seq data analysis***

We pooled DNA originating from at least 18 different ChIP experiments conducted as described above. The ChIP DNA was prepared into libraries and sequenced using an Illumina HiSeq apparatus at the GenomEast platform (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et cellulaire; Strasbourg, France). Pooled control inputs DNA were processed in parallel. Reads were aligned onto the indexed chromosomes of the human hg19 (GRCh37) genome using bowtie 0.12.7<sup>34</sup>, allowing at most two mismatches (parameters  $-n\ 2$ ;  $-l\ 28$ ;  $-m\ 1$  with  $--best$  and  $--strata$  options). Sequencing statistics are given in **Supplementary Table 2**. Samtools 0.1.12a<sup>35</sup> implemented under galaxy (<https://usegalaxy.org/>) were used to generate signal files. Duplicate reads were removed using the rmDupBam tool, and GCbias were subsequently corrected by the compute/correct GC bias algorithms included in the DeepTools package. MACS 2.1.1.2016<sup>36</sup> was then used for converting signal into .wig files and peak calling using low/up mfold bound adjusted to 5 and 50 respectively and at different *P*-values cutoff, as previously performed<sup>32</sup>. Input control file was used as reference for these peak-calls. The obtained .bed files corresponding to the genomic coordinates of identified ER $\alpha$  BSs were subsequently filtered against the lists of repetitive sequences obtained from the UCSC (blacklist; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin>). Regions exhibiting high background signal generated by a poor normalization to input due to excessive sequences overrepresentation (consecutive of the highly rearranged genome of MCF7 cells) were also removed. Identified genomic regions are provided in the **Supplementary File 1**. For alignment and calculations mean signals at precise subset of genomic regions, we corrected the bias of diverging sequencing depths between different samples by normalizing the signal intensities of a given .wig to the one with the highest sequencing depth. Motifs analyses were performed using the CentDist (<http://biogpu.ddns.comp.nus.edu.sg/~chipseq/webseqtools2>) and SeqPos (<http://cistrome.org/ap/><sup>37</sup>) algorithms. All other integrative analyses of the ChIP-seq data were performed using home-made scripts and algorithms from the cistrome web-platform (<http://cistrome.org/ap/>).

### **DATA deposition**

The microarray and ChIP-seq data generated in this study have been submitted to the NCBI Gene Expression Omnibus website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)<sup>38</sup> under accession No. GSEXXXXXXXXXX.

## Results

### **The expression of a constitutively active form of MKL1 in MCF7 cells provokes a transition from luminal to basal-like phenotype.**

The transcriptional coactivator MKL1 is mainly cytoplasmic and inactive in luminal ER $\alpha$ -positive breast cancer cell lines such as MCF-7<sup>27</sup>. Using a tetracyclin-inducible vector system (T-Rex), we previously established sub-clones from MCF7 expressing a N-terminal deleted mutant of MKL1 (MKL1  $\Delta$ N200) devoid of the RPEL motifs (actin binding sites), allowing a permanent translocation into the nucleus and a constitutive activity<sup>27,28</sup>. Quantitative RT-PCR experiments targeting a limited panel of genes had shown repressed expression of ER $\alpha$ , PR and HER2 in these cells<sup>27</sup>, a typical profile found in TNBCs or basal-like tumors<sup>2,16</sup>. To further explore the changes in gene signature induced by the MKL1 mutant, we analyzed the gene expression profiles of MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 and MCF7 control cells through microarray experiments. Our analysis revealed that a great number of genes has an altered expression between both cell lines. Among the genes listed within the top of this list are several genes that we previously described as exhibiting an altered expression in our previous work<sup>27,28</sup>. Refer to [Supplementary File 2](#) for a complete list of genes with their corresponding *P*-values and log2 fold changes. For subsequent analyses we defined a set of differentially expressed genes setting an arbitrary cut-off of adjusted *P*-value < 0.01 and a fold change >  $\pm$ 4. This threshold resulted in a set of 1016 up-regulated and 976 down-regulated genes in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 as compared to MCF7 control cells. Using these lists of genes we performed an ontology analysis to elucidate biological processes and pathways that could characterize MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells. This analysis revealed an overrepresentation of genes involved in cell adhesion, ECM-receptor interactions, actin cytoskeleton organization and migration and well as genes involved in kinase cascades and signal transduction, functions that are consistent with the induction of EMT<sup>39</sup>. Furthermore, we found an underrepresentation of genes involved in epigenetic modulations such as chromatin remodeling or DNA methylation, processes that have been also associated with EMT<sup>40,41</sup>. Kegg enriched pathways are shown in [Figure 1A](#). For complete lists of Gene Ontology terms and Kegg Pathways enriched in our dataset see [Supplementary File 3](#) and [File 4](#) respectively.

Because patterns of gene expression allow classifying breast tumors in major molecular subtypes, we next investigated the expression of subsets of genes that are distinctive of clinically relevant breast cancer subgroups. We selected 27, 33 and 7 genes which have been associated to basal-like, luminal-like and HER2-overexpressing tumors, respectively<sup>3,42</sup> ([Supplementary File 5](#)), and compared the expression of these genes between MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 and control cell lines. In [Figure 1B](#),



boxplots of the log<sub>2</sub> FC expression values of these genes are shown. An overexpression of genes associated to basal tumors and an underexpression of genes associated to luminal and ERBB2 tumors in MCF7 MKL1 ΔN200 cells compared to control cells can be appreciated. Means of the log<sub>2</sub> FC expression values for characteristic genes of the three tumor subgroups were computed and t-tests were ran to assess whether these means are significantly different from zero. Mean values for genes in basal-like, luminal-like and ERBB2-overexpressing groups were 1.0, -0.9 and -0.8 respectively with 0.0792, 0.0003 and 0.0064 associated p-values, suggesting that MCF7 MKL1 ΔN200 cells have an expression profile similar to basal like-tumors.

Hence, the microarray analysis described above establishes a transition from luminal to basal-like phenotype of MCF7 MKL1 ΔN200 cells. To confirm this conclusion by other means, we performed immunocytology experiments aiming to follow the expression and localization of biomarkers for these particular breast cells (**Figure 1C** and **Supplementary Figure S1**). First, as expected, while MKL1 translocation was a very rare event in control cells, we observed that the MKL1 mutant was translocated in the nucleus of more than 80% of MCF7 MKL1 ΔN200 cells. All basal-like biomarkers studied, for instance cytokeratin 14, P-cadherin, N-cadherin, vimentin, alpha actin and the human epidermal growth factor 1 (HER1), were up-regulated in MKL1 ΔN200 cells (**Supplementary Figure S1**). Moreover, FOXC1, the main transcription factor regulating EMT in basal-like breast cancers <sup>43</sup>, was also strongly induced in these cells (**Figure 1C**). Among luminal biomarkers, cytokeratin 18 staining was not affected, but E-cadherin exhibited a disrupted network and the luminal pioneer factor GATA3 was drastically repressed. As GATA3, the expression level of ERα dropped by 60%. Interestingly, the pioneer transcription factor FOXA1 exhibited a different pattern with a clear increase of its expression in MCF7 MKL1 ΔN200 cells. Finally, the expression level of the human epidermal growth factor 2 (HER2) was inhibited by the constitutively active form of MKL1.

Altogether, these results clearly show that an increased nuclear-translocation and a constitutive activity of MKL1 shift the characteristics of MCF7 breast cancer cells from a luminal to a basal-like phenotype.

### **MCF7 MKL1 ΔN200 cells lose E2 transcriptional regulation**

In order to monitor estrogen signaling changes during luminal to basal-like transition, we used a microarray-based transcriptome analysis to identify E2-regulated genes in MCF7 MKL1 ΔN200 and control cells. For that purpose we compared in both cell lines gene expression levels following a 4h treatment with E2 or ethanol as vehicle control. We performed a differential gene expression (DE) analysis and selected an arbitrary cutoff of adjusted *P*-value < 0.05 and fold change > ±1.8 to define

DE genes. For a complete list of genes with their corresponding *P*-values and log<sub>2</sub> fold changes in control and MCF7 MKL1 ΔN200 see [Supplementary Files 6](#) and [7](#) respectively. Differential gene expression analysis showed 225 differentially expressed genes in control cells when treated with E2 ([Figure 2A](#); 185 up-regulated and 40 down-regulated). Gene Ontology and pathway enrichment analysis of these genes revealed as expected some terms and pathways which have been previously described as E2-regulated in MCF7 cells, such as localization, cell communication and pathways in cancer<sup>44</sup>. For complete lists of Gene Ontology terms and Kegg Pathways enriched in our dataset see [Supplementary Files 8](#) and [9](#), respectively. Strikingly, only 2 up-regulated genes were found in E2-treated MCF7 MKL1 ΔN200 and none were repressed by E2 ([Figure 2A](#)). These 2 genes were included within the E2-sensitive transcriptome of control cells. In general, the average of the fold-changes of the 185 up-regulated genes in control cells dropped from 2.3 to 1.2 in MCF7 MKL1 ΔN200 cells, while the one of the 40 down-regulated genes increased from 0.5 to 0.87. These data indicate that MCF7 MKL1 ΔN200 almost lose E2 transcriptional regulation.

Since the expression of the MKL1 ΔN200 deeply impacts gene expression profile in the absence of ligand, we next sought to interrogate whether specific variations of gene basal activity could be correlated to the loss of their estrogenic response. Among the 223 mRNAs that lose their responsiveness to E2 and the two which have retained an E2-regulation, 109 presented changes in their transcriptional activity in the absence of ligand, including approximately half of the E2 up-regulated and E2 down-regulated genes. We categorized these 109 mRNAs in 4 categories depending upon the fold changes of their basal activity and of their response to E2 in control MCF7 cells. As shown within [Figure 2B and 2C](#), the E2 up-regulated genes in control cells were distributed equally between those whose basal expression is down-regulated and those whose basal expression is up-regulated in MCF7 MKL1 ΔN200 cells (C2 and C4 categories in [Figure 2B and 2C](#)). In contrast, the basal activity of the majority of the E2 down-regulated genes in control cells (C1 and C3) were also down regulated in the presence of MKL1 ΔN200, which might indicate a correlation between E2 and MKL1 effects for the E2 down-regulated genes only. Gene ontology and pathway enrichment analysis of the categories of genes could not be achieved due to the limited number of genes by category. However, it should be noted that some genes, which are generally considered as hallmarks of hormone-resistant breast cancer cells, exhibited changes in expression expected to lead to such a cell phenotype. This is for instance the case of genes encoding the transcription factor FOXC1 and the growth factor AREG (amphiregulin) in the C2 category of genes whose expression is up-regulated both by E2 and MKL1 ΔN200 and the chemokine CXCL12 in the category of genes (C4) in which MKL1 ΔN200 strongly counteracts the stimulating effect of E2.

### Expression of the constitutively active MKL1 $\Delta$ N200 protein in MCF7 impacts ER $\alpha$ cistrome.

We next sought to determine whether the abrogation of gene responses to E2 observed in MCF7 cells expressing the MKL1  $\Delta$ N200 protein was correlated to an effect of this mutant on ER $\alpha$  mobilization to its sites. To this purpose, we treated control and MKL1  $\Delta$ N200 expressing cells with E2 or ethanol vehicle for 50 min, a time point adequate for determining representative direct sites of ER $\alpha$  binding to chromatin genome-wide<sup>45</sup>, and subjected the prepared chromatin to ChIP-seq as previously<sup>33</sup>. Bioinformatic treatment of these data included a filtration of the identified ERBSs against regions referenced as repetitive and sources of ChIP-seq biases as well as against regions heavily duplicated/remodeled within MCF7 cells genome (see the Materials and Methods section as well as [Supplementary Figure S2](#)). The number of ERBSs retained before and after these filtering steps is given within [Supplementary Table S3](#). To ascertain the elimination of a maximum of false-positive regions, we measured the mean enrichment of ER $\alpha$  ChIP-seq signal at ERBSs determined at different *P*-values, and subsequently selected those for which the signal/noise exceeded a 2-fold ratio (see [Supplementary Figure S2](#)). The Venn diagrams presented within [Figure 3A to 3D](#) illustrate the overlap between the different set of ERBSs identified in each cell lines in the presence of absence of E2 at these optimal *P*-values. Mean ChIP-seq signals measured on each specific subset of ERBSs are illustrated on the bottom of each Venn and confirm their selectivity ([Figure 3E to 3H](#)).

In both cell lines, the number of common ERBSs found in EtOH and E2 conditions was relatively low (less than 5% or 1% of the ERBSs bound by ER $\alpha$  in the presence of E2 in control or MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, respectively). Interestingly, ER $\alpha$  cistromes included 6,237 or 2,658 ERBSs in E2-treated control or MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, respectively. This indicated that the expression of the constitutive MKL1  $\Delta$ N200 protein influences ER $\alpha$  cistrome by firstly reducing the number of ERBSs. Such a conclusion may also be made in the absence of ligand with 1,439 and 454 ERBSs identified in control or MKL1  $\Delta$ N200 cells. In addition, the overlaps between the cistromes of ER $\alpha$  in each cell line are relatively poor ([Figure 3C and 3D](#)): only 1 ERBS in the absence of ligand and 367 in the presence of E2. This indicates that some reprogramming of ERE binding on the genome has further occurred following the expression of the MKL1  $\Delta$ N200 protein. Importantly, using cistromes determined at less or more stringent *P*-values raised similar conclusions towards these overlaps (see [Supplementary Figure S3](#)). Hence, a maximum of 2% of the ERBSs identified in EtOH-treated control cells were common with those identified in similarly treated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The overlap reached 32% at low-stringency for E2 treated cells (see [Supplementary Figure S3](#)). To stress the robustness of our analysis, we performed ChIP-qPCR experiments on subsets of categorized ERBSs. Results obtained from these experiments are summarized in part of [Figure 4](#), and confirm that 100 % of the 4 lost and 4 gained tested ERBS recapitulate the expected profiles of enrichment. Interestingly, we also

observed that the mobilization of ER $\alpha$  on common ERBSs located at the vicinity of E2 regulated genes such as *GREB1* was also strongly reduced in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells (**Figure 4**). Similarly, these ChIP-qPCR experiments evidenced a reduced or absent recruitment of ER $\alpha$  on distant enhancers establishing chromatin loops (as extracted from the ChiA-PET data from Fullwood et al., 2009<sup>46</sup>) with the promoter of the two genes which are still regulated by ER $\alpha$  in MCF7 cells expressing the constitutive version of MKL1: *GPR68a* and *IFITM10a*.

Above results all indicate that the ectopic expression of the MKL1  $\Delta$ N200 protein does impact ER $\alpha$  cistrome in MCF7 cells. To assess whether this reorientation of ER $\alpha$  binding has a direct functional influence on MCF7 cell biology, we checked whether genes putatively regulated by these ERBSs share specific or similar annotations. To do so, we applied GREAT onto our data (<http://great.stanford.edu/>)<sup>47</sup>, and found a number of associations of the ER $\alpha$  cistrome in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells with genes involved in EGF and RAS pathways. This was especially visible in the ethanol condition (see **Supplementary Figure S4** and complete annotations in **Supplemental File 10**).

We next investigated whether these specific cistromes could reflect the engagement of ER $\alpha$  on different type of DNA sequences. As visible from the motifs analysis summarized within **Table 1** (full analysis provided within **Supplementary File 11**), EREs are the first motifs found in each cistromes except within sites bound by ER $\alpha$  in the absence of E2 in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. This again points to the conclusion that the very limited cistrome of ER $\alpha$  in this condition has specific properties. Accordingly, whilst the overlap of our ER $\alpha$  cistromes with the binding sites of other transcription factors determined in MCF7 cells (**Supplementary table S4**) did not evidence the existence of a preferential cofactor for the specific ERBSs from MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, it clearly shows that the ER $\alpha$  cistrome in these cells in the absence of E2 is particular as it does not cluster with the others (**Figure 3I**). It can be noted that the ERBSs of these untreated cells present a depletion of GATA3 binding sites and the maintenance of enrichment in FOXA1. Since MKL1 is a coactivator of SRF, we envisioned that the specific ERBSs from MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells could be enriched in SRF binding sites. However, our motif analysis and search using known PSSM matrices (data not shown) showed that it is not the case.

These conclusions led us to hypothesize that the loss of any estrogenic regulation in the MKL1  $\Delta$ N200 cells could be a consequence of the impacted mobilization of ER $\alpha$  onto chromatin in the absence of ligand. We therefore interrogated the ER $\alpha$  cistromes characterized in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells to determine whether they may correlate with specific variations of gene basal activities preventing their estrogenic response. To do so we first identified the closest ERBS from the TSS of the genes included in the 6 categories previously defined (**Figure 2B** and **2C**). As shown within **Figure 3J**, there was no obvious correlation between the variations in the basal transcriptional

activity of a given gene category and either the conservation/gain or loss of their most proximal ERBS. For instance, genes with increased (C1 and C2) or decreased (C3 and C4) basal activity did not present coordinated changes in ERBS proximity significantly different from control genes with no changes in basal activity (C5 and C6). On the other hand, genes from the C2 and C4 categories of genes up-regulated by E2 in control cells seemed to conserve their more proximal ERBS in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells more frequently than the other categories. In the opposite, down-regulated genes (C1, C3 and C6) have a tendency to gain an ERBS at their vicinity. These observations led us to check whether the levels of mobilization of ER $\alpha$  rather than the existence of the ERBS in itself could correlate better with the transcriptional activity. We therefore retrieved the mean ChIP-seq signal from the conserved proximal ERBSs of the categorized genes, as well as the lost ones as a control. These analyses, summarized within [Figure 3K](#) indicate that the mobilization of ER $\alpha$  on all conserved ERBSs from all categories is significantly reduced in the presence of E2 in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. This is also the case in the absence of E2, except in the C2 category.

In summary our comparative analysis of ER $\alpha$  cistrome in MCF7 and MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells indicates that ER $\alpha$  binding on the MCF7 cell's genome is strongly affected by the expression of the mutant MKL1 protein. This reprogramming involves a massive loss of ERBSs and a diminished recruitment of ER $\alpha$  on conserved ERBSs that may explain at least partly the loss of estrogenic transcriptional regulations. This is certainly partly associated with the loss of ER $\alpha$  protein amounts in MKL1  $\Delta$ N200 cells, but novel ERBSs also appear in these cells although their association with a particular physiological function remains unclear except for the EGF and RAS pathways.

### **ERBSs enrichment in H3K27ac is altered in MCF7 MKL1 $\Delta$ N200 cells**

We reasoned that the novel ERBSs identified in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 might not be functional in terms of chromatin remodeling required for transcriptional modulations. We therefore determined whether these ERBSs and variations in ER $\alpha$  mobilization on ERBSs in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells were associated with changes in chromatin structure around enhancers. We investigated the enrichment of ERBSs in dimethylated H3K4 (H3K4me2) and acetylated H3K27 acetylation (H3K27ac) in response to estrogenic treatment. Both chromatin marks are present at active enhancers and promoters, and H3K27ac is a major histone modification deposited at nucleosomes flanking enhancer elements by coactivators with histone acetyl activity (HAT) recruited by ERK and other transcription factors <sup>48</sup>. ChIP-qPCR experiments were performed on the same subsets of categorized ERBSs and with the same chromatin samples previously used to confirm ER $\alpha$  recruitment ([Figure 4A](#)). As illustrated within the heatmap in [Figure 4A](#), the enrichment of all tested ERBSs in H3K4me2 was found

independent of E2, as expected, in both cell lines. Importantly, the H3K4me2 levels were significantly lower in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells on the tested lost ERBSs (see [Figure 4B](#) for the mean signals and statistics). In contrast, gained ERBSs did not present a differential enrichment in H3K4me2 depending upon the cell and/or treatment. This suggests that the gained ERBSs are genomic regions which are already poised for functionality in the absence of ER $\alpha$ , at least for those which we tested. H3K27ac enrichment at ERBS was extremely different between both cell lines with a clear decrease in common ERBSs, which was amplified in lost ERBSs. Importantly, although already present in MCF7 control cells within gained ERBSs there was a significant rise in the amounts of H3K27ac at these regions in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells. Interestingly, although insensitive to E2 in tested lost and gained ERBSs, 6 of the 7 common tested ERBSs showed an increased enrichment in H3K27ac in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells following E2 treatment, leading to a partial restoration of the levels of its enrichment when compared to control MCF7 cells ([Figure 4A](#) and [4B](#)).

Altogether, these data indicate that gained ERBSs are, for the ones tested, already in a poised/prepared state and that the expression of the constitutively active form of MKL1 disturbs ERBS H3K27 acetylation in a close associated with changes in ER $\alpha$  mobilization.

### **Expression of MKL1 $\Delta$ N200 protein in MCF7 impacts ER $\alpha$ subcellular localization and its dimerization state equilibrium**

The altered ER $\alpha$  cistrome in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells led us to analyze in more detail ER $\alpha$  dynamic in these cells. As previously mentioned, the expression level of ER $\alpha$  is reduced by 60-70% in MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 cells compared to untreated control MCF7 cells. In addition, immunofluorescence experiments showed that the remaining ER $\alpha$  relocates from the nucleus to the entire cell, partly depleting the nucleus of MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells from the receptor ([Figure 5A](#)). To further characterize whether ER $\alpha$  properties are changed in MCF7 cells expressing the mutant MKL1 proteins, we performed a saturation [ $^3$ H]-E2 binding assay using whole cell extracts of control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. [ $^3$ H]-E2 binding was specific in both cell extracts with 3 times more specific binding sites in control than MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, in agreement with the ER $\alpha$  expression level measured in Western blots and immunofluorescence experiments ([Figure 5B](#)). The equilibrium dissociation constants ( $K_d$ ) tend toward a common value (0.4 nM) in both cell types. However, the Scatchard plot from MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells was almost linear whilst the one from control MCF7 cells revealed a convex curve with a positive cooperativity ([Figure 5B](#), bottom panel). Such a phenomenon was previously shown to depend upon the monomer/dimer equilibrium of the binding element <sup>49</sup>, thereby suggesting here the existence of an imbalance in favor of ER $\alpha$  monomer in

untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. This result and the fact that the ERBSs identified in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells were not enriched in ERE motif which binds ER $\alpha$  as a dimer led us to question whether ER $\alpha$  homodimers were actually present in these cells. Furthermore, a diminished population of ER $\alpha$  dimers could also be part of the causes responsible for ER $\alpha$  cistrome reprogramming in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells and their loss of E2-responsiveness. For that purpose, we performed a proximity ligation assay (PLA) using a monoclonal ER $\alpha$  antibody directly conjugated to the MINUS and PLUS probes. Recognizing the same epitope, the two ER $\alpha$  probes interact together only if ER $\alpha$  is under a homodimer form, with one probe on each monomer. To validate the approach, we first established the relationship between the amounts of ER $\alpha$  homodimers assessed by PLA and the expression level of ER $\alpha$  measured by immunofluorescence in untreated and E2-treated control MCF7 cells (see [Supplementary Figure S5](#)). Cells were classified according to the relative intensity of ER $\alpha$  staining, grouped in intensity window. The number of dots per cell was then averaged for a given intensity window. The results obtained by this method demonstrated that the number of homodimer dots per cell is proportional to the ER $\alpha$  amount above a threshold of receptor. The threshold was 2-3 times lower in presence than in absence of E2. This fold change was in agreement with previous FRET-based studies measuring apo and holo ER $\alpha$  homodimer affinity<sup>50,51</sup>, which validates our PLA approach (see [Supplementary Figure S5](#)). A further analysis of our PLA data showed that the homodimer dots were mainly nuclear in control cells (80%), roughly increasing twice after E2 treatment. On the contrary, they were distributed uniformly throughout the cells in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, and their numbers were reduced ([Figure 5C](#)). Finally, to ensure definitively that MKL1  $\Delta$ N200 expression in MCF7 impacts ER $\alpha$  monomer/dimer equilibrium, we extended our study by monitoring ER $\alpha$  interaction with HSP70 using the PLA approach. ER $\alpha$  is indeed considered to be associated in its monomeric form to chaperone proteins such as HSP90 and HSP70 in the absence of E2<sup>52,53</sup>. Dissociation from the chaperone complexes is induced by E2 and is a prerequisite to ER $\alpha$  dimerization. Results clearly show a reduction in the number of ER $\alpha$ /HSP70 interactions in both cell types after E2 treatment ([Figure 5D](#)). They also show a greater number of ER $\alpha$ /HSP70 interactions in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, thereby confirming the imbalance of the monomer/dimer equilibrium in favor of the monomer state in these cells. Additionally, in accordance with ER $\alpha$  sub-localization in these cells, these interactions were mostly detected in the cytoplasm.

In conclusion, the expression of the active form of MKL1 in untreated MCF7 cells down-regulates ER $\alpha$ , its homodimerization and relocates them throughout the cell. The nuclear depletion of ER $\alpha$  homodimer was only very partially restored in presence of E2.

## **ER $\alpha$ interaction with P160 family coactivators is partly relocated outside the nucleus of MCF7 MKL1 $\Delta$ N200 cells**

To further explore ER $\alpha$  functional changes, we then studied the expression and localization of two of its main coactivators, SRC1 and SRC3/AIB1, which are members of the steroid receptor coactivator P160 family<sup>54,55</sup>, as well as their ability to interact with ER $\alpha$  in both cell types (**Figure 6**). The amounts of SRC1 at RNA and protein levels were comparable between control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, whereas SRC3 was two-fold induced in cells expressing MKL1  $\Delta$ N200 (data not shown). The major difference between the two cell types was in the cellular location of the coactivators. Indeed, SRC1 and SRC3 were relocated, as ER $\alpha$ , from a main nuclear localization in control MCF7 cells to the whole volume of MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. As shown in **Figure 6A**, this phenotype of MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 was also observed for a very small proportion of control MCF7 cells. Measured by PLA, the interactions between ER $\alpha$  and the two coactivators followed the same relocation after expression of MKL1  $\Delta$ N200 (**Figure 6B**). This resulted in a clear decrease in the number of dots in the nucleus of untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. In contrast to control cells, an E2 treatment strongly enhanced ER $\alpha$ /SRC interactions in a uniform manner in whole MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. It is interesting to note that changes in the nuclear ER $\alpha$ /SRC interactions were almost in agreement with changes in H3K27ac for the common ERBSs (**Figure 4**). As expected, treatment of both cell types with the pure antagonist ICI 182,780 abolishes ER $\alpha$ /SRC interactions (see **Supplementary Figure S6, panel A**).

Altogether, these data clearly indicated that MKL1  $\Delta$ N200 expression partly relocates ER $\alpha$ /SRC interaction outside the nucleus, which greatly reduces the functional modulations mediated by this complex at the nuclear level.

## **Expression of the constitutively active MKL1 $\Delta$ N200 protein in MCF7 cells favors ER $\alpha$ interaction with several kinases of estrogen non-genomic pathways.**

In addition to its transcriptional task, ER $\alpha$  is also known to modulate non-genomic pathways through a protein pool located at the cytoplasm and/or plasma membrane<sup>55,56</sup>. Indeed, ER $\alpha$  interacts with several kinases such as c-src and PI3K for the main ones, regulating by this way the downstream MAPK and Akt signaling pathways. Subsequent cellular responses may ultimately result in the regulation of gene expression through the phosphorylation of transcription factors, co-regulators or structural components of chromatin. For instance, the ER $\alpha$ /ERK/MSK1 complex was shown to phosphorylate histone H3 at serine 10 (H3S10)<sup>57</sup>. These data, together with the observed relocalization of ER $\alpha$  within the whole cell volume in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cell line led us to consider and test ER $\alpha$  interaction with several partner kinases. For that purpose, ER $\alpha$ /c-src, ER $\alpha$ /PI3K and



ER $\alpha$ /MSK1 interactions were investigated by PLA in both control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cell lines. Results are depicted within [Figure 7A](#). We clearly observed an interaction between ER $\alpha$  and the two kinases c-src and PI3K in control MCF7 as previously described by Poulard et al.<sup>58</sup>, and we confirmed the existence of an ER $\alpha$ /MSK1 interaction. With the exception of ER $\alpha$ /PI3K, the interactions were significantly up regulated by E2. Interestingly, these interactions were 3 fold increased in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. They were further modulated by E2 either by being inhibited (ER $\alpha$ /c-src, ER $\alpha$ /PI3K) or by being increased (ER $\alpha$ /MSK1). Unexpectedly, while ICI had no impact on ER $\alpha$ /c-src interactions in control MCF7 cells, it further enhanced ER $\alpha$ /c-src complex formation in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells ([Supplementary Figure S6](#)). We next examined by Western blot and immunofluorescence experiments the phosphorylation status of ERK, AKT and H3S10 in both cell types. As expected, phosphorylation of the three proteins was up-regulated by E2 and down-regulated by ICI in control MCF7 cells ([Figure 7B](#) and [7C](#) and [Supplementary Figure S6](#)). The expression of the MKL1  $\Delta$ N200 form drastically enhanced these phosphorylation processes in an E2-independent manner. E2, as ICI, only further enhanced the amounts of phosphorylated AKT.

Altogether, these data clearly show that the expression of the constitutively active MKL1  $\Delta$ N200 in MCF7 favors ER $\alpha$  interaction with partners of the non-genomic pathways in an E2-independent manner. Furthermore, the phosphorylation status of ERK, AKT and H3S10 paralleled these interactions.

## Discussion

Thirty to 50% of recurrent tumors that arise from ER $\alpha$ -positive primary breast cancer patients do not respond to endocrine therapy<sup>8,9</sup>. While the majority of these breast tumors retain detectable amount of ER $\alpha$ , loss of ER $\alpha$  expression represents a non-negligible step in the progression from endocrine sensitive to resistance<sup>20</sup>, shifting the tumors subtype from luminal to basal-like phenotype<sup>11</sup>. Understanding the underlying mechanisms of this progression is a major challenge towards the design of efficient hormone therapy-based treatments of breast cancers with reduced or ideally no relapses. We previously examined the processes controlling the tissue specific activity of ER $\alpha$  and identified the Rho/actin/MKL1 signaling pathway as a main actor, capable of strongly inhibiting the transcriptional capability of the receptor<sup>59</sup>. MKL1 is a master regulator of actin dynamic and cellular motile functions in many processes<sup>21,22</sup>. In breast tissue, MKL1 is vital in sustaining differentiation and function of mammary myoepithelial cells, accountable for ejection of the milk during lactation<sup>60,61</sup>. During malignancy, MKL1 plays also an essential role in tumor cell invasion and metastasis<sup>23</sup>. Confirming this latter role, we showed that the MKL1 signaling pathway was indeed silent in the luminal ER $\alpha$ -positive breast cancer cell lines and active in ER $\alpha$ -negative breast cancer cell lines which have undergone EMT<sup>27</sup>. We further demonstrate in the present study that a constitutive activation of MKL1 in ER $\alpha$ -positive breast cancer cells results in a genetic and phenotypic reprogramming from luminal to basal-like cancer cell subtype conferring changes in the expression and the functional properties of ER $\alpha$ .

As expected, the expression of a constitutively active form of MKL1 in MCF7 cells modulated the expression of numerous genes whose ontologies are associated with pathways involved in the regulation of actin cytoskeleton, focal adhesion, ECM-receptor interaction and cell migration. Importantly, the evaluation of the expression of subset of genes associated with specific breast cancer subgroup gene signature showed that the MKL1  $\Delta$ N200 expression triggered a shift from a luminal to a basal-like gene expression profile. Notably, the expression of the pioneer factor GATA3 and ER $\alpha$  were down-regulated whilst that of the transcription factor FOXC1, a pivotal diagnostic marker for basal-like breast cancer<sup>43</sup>, was induced. Of interest, FOXC1 is localized to the basal/myoepithelium in normal breast tissue and is particularly enriched in the luminal progenitor cell population, which is thought to be at the origin of basal-like tumors<sup>62</sup>. Markedly, the ectopic expression of FOXC1 was shown to induce a progenitor-like phenotype in differentiated mammary epithelial cells. Likewise, FOXC1 expression was associated with decreased or undetectable ER $\alpha$  expression in recurrent tumors from ER $\alpha$ -positive primary breast cancers, which were treated with endocrine therapy<sup>63</sup>. Amongst the possible mechanisms involved in this silencing of ER $\alpha$  expression, FOXC1 was shown to counteract GATA3 binding on ER $\alpha$  promoter region<sup>63</sup>. The switch between

GATA3 and FOXC1 hence appears to be a good indicator of breast cancer luminal to basal-like reprogramming<sup>63,64</sup>. Unlike GATA3 and ER $\alpha$ , FOXA1 was still present, even with an increased abundance, in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. This may appear paradoxical because FOXA1 is generally associated, as GATA3 and ER $\alpha$ , with the luminal subtype<sup>15</sup>. However, recent studies evidenced an overexpression of FOXA1 in breast cancer metastases that are resistant to endocrine therapy, suggesting an altered role of FOXA1 in disease progression<sup>14</sup>. The presence of FOXA1 might also be related to the fact that the transition of MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells from a luminal to a basal-like phenotype is not total. Accordingly, we observed that MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells still express some luminal markers such as cytokeratin 18.

Our microarray data further showed that the expression of MKL1  $\Delta$ N200 in MCF7 cells almost abolishes all E2-mediated transcriptional modulations. Of the 225 E2-regulated genes identified in MCF7 control cells, only two retain an E2-regulation in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The loss of E2-regulation was concomitant with a major overhaul in the basal expression of genes. For 28% of these genes, the change in their basal activity was in the same direction as the E2-response. Among these genes, we found amphiregulin, the main growth factor mediating E2-driven epithelial proliferation in a paracrine fashion<sup>65</sup>. Amphiregulin was also shown to be involved in breast cancer progression, contributing to cell motility and invasion. The sharp increase of its expression in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells in a constitutive and E2-independent manner, associated with a higher expression of HER1 obviously contributes to the hormonal escape of these cells. For other E2-responsive genes such as the chemokine CXCL12, the changes in their basal expression were opposite to their normal E2-regulation. Here again, a shutdown of the expression of CXCL12 associated with a high expression of its receptor CXCR4, as observed in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, is known to favor metastasis, cancer cells migrating *in vivo* to organs that express high level of CXCL12<sup>66</sup>. The absence of an obvious correlation between direction in changes of basal gene expression and direction of E2-responses (up vs down), allows us to almost exclude the hypothesis of a ligand-independent activity of ER $\alpha$  on these genes. Furthermore, we previously showed that changes in the basal expression of E2 target genes in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells were also insensitive to tamoxifen treatment<sup>27</sup>, demonstrating unambiguously that the presence of a constantly active MKL1 in MCF7 induces endocrine resistance.

ChIP-seq experiments performed on endocrine resistant breast cancers and cell lines that retained ER $\alpha$  expression showed a clear increase in both the number and the intensity of the ERBSs<sup>14</sup>. Notably, the highest ER $\alpha$  chromatin binding signal intensities were observed in metastatic samples, suggesting a correlation with disease progression<sup>14</sup>. The estrogen responsive element (ERE) was the main DNA motif enriched in the ERBSs. It should be noticed that ligand-free constitutively activated mutant forms of ER $\alpha$  are often reported in endocrine resistant breast cancer metastases<sup>67</sup>.

Because of the high ER $\alpha$  expression, these endocrine resistant cancer cells still remain on a luminal phenotype. Our data show that endocrine resistant breast cancer cells which result from a luminal to basal-like transition exhibit in contrary a reduced number of ERBSs generally associated with lower ER $\alpha$ -binding intensity. Besides a reduced overlap between the ER $\alpha$  cistromes identified in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, we also identified novel ERBSs in cells expressing the MKL1  $\Delta$ N200 protein. This was particularly true in untreated cells for which the overlap was very low. Interestingly, a number of genes located in the vicinity of these new ERBSs were associated with growth factor pathways, notably in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. This could be related to the sharp increase of expression of members of the EGF family (amphiregulin as above mentioned, but also TGF $\alpha$  and HB-EGF) and their receptor in these cells. Ross-Innes et al <sup>14</sup> previously showed that ER $\alpha$  positive breast cancer cell lines treated with a mitogenic cocktail present novel ERBSs at chromatin sites already bound by FOXA1 or to which FOXA1 was recruited in response to mitogenic stimulus. This phenomenon was also observed in ER $\alpha$  positive cancers with poor prognosis or metastatic ones. This supports the hypothesis that FOXA1 might mediate ER $\alpha$ -binding reprogramming in advanced diseases. Partly corroborating the hypothesis, the comparison of the new ERBSs identified in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells with those of FOXA1 determined in MCF7 show maintenance of FOXA1 enrichment. In contrast, was observed depletion in GATA3 binding events at these sites. Importantly, the reprogramming of ERBSs in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells is therefore closely associated with the changes observed in the expression level of the two pioneer factors in these cells: down-regulation of *GATA3* and up-regulation of *FOXA1*. E2 treatment allows MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells to regain enrichment profiles closer to those observed in control cells. The exact functional consequence of ERBS reprogramming in cells expressing the constitutively active form of MKL1 remains however poorly understood due to the lack of E2 transcriptional regulation in these cells.

A remarkable feature of the new ERBSs detected in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells was the absence of ERE motifs while they were the first elements found in control MCF7, as expected but also in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 treated with E2. To decipher the reasons of these changes, we thoroughly investigated ER $\alpha$  dynamics. ER $\alpha$  expression was rapidly down regulated after the expression of MKL1  $\Delta$ N200 protein, reaching a level which was nevertheless comparable to the one observed in control MCF7 cells treated with E2. The decrease in the expression level was concomitant with a redistribution of ER $\alpha$  throughout the cell such, deeply impacting ER $\alpha$  concentration in the nuclear compartment. By the single mass action law, changes in ER $\alpha$  concentration should affect reaction equilibria involving ER $\alpha$ , the first of which being undoubtedly the monomer/dimer equilibrium. ER $\alpha$  has been shown to partly exist as a dimer even in the absence of ligand, ligand-binding enhancing the

dimer formation and the interaction between both monomers<sup>50,51</sup>. Since a long time, Scatchard analysis have demonstrated a cooperativity in [<sup>3</sup>H]-E2 binding on ER $\alpha$  which was dependent on the monomer/dimer equilibrium resulting from ER $\alpha$  concentration in the tissue extract<sup>49</sup>. A decrease in ER $\alpha$  concentration unbalances ER $\alpha$  monomer/dimer equilibrium in favor to the monomer, which consequently reduce the cooperativity in ligand binding. Reduced amount in ER $\alpha$  homodimers was obviously the reason why no cooperativity in E2-binding was observed in whole cell extract from MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The hypothesis was strengthened by PLA experiments specifically targeting ER $\alpha$  homodimers in both cell types. The presence of ER $\alpha$  homodimer was indeed drastically reduced in the nucleus of cells expressing the MKL1  $\Delta$ N200 protein. Moreover, the estrogenic treatment restores a number of homodimer only comparable to the one detected in untreated control MCF7 cells. Finally, the evaluation of the number of ER $\alpha$  complexes with the chaperone protein HSP70 detectable by PLA confirmed that ER $\alpha$  is preferentially found as monomers in untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. Obviously, the combination of a significant decrease in the expression level of ER $\alpha$  and a consequent displacement of the homodimer/monomer equilibrium towards the monomer state may directly account for the fewer and less intense ERBSs in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. Since ER $\alpha$  binds ERE motifs through its dimeric form only, these observations might further explain the lack of detection of ERE motifs in the ERBSs of untreated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells and the presence of ERE-enriched ERBSs after that estrogen have induced ER $\alpha$  dimerization in the cells.

Importantly, the change in ER $\alpha$  monomer/dimer equilibrium may also impact ER $\alpha$  interaction with specific genomic and non-genomic partners. In addition to its ability to regulate gene expression by binding directly to DNA at EREs, which represents most of the E2-dependent recruitment to the genome, ER $\alpha$  is also known to engage DNA via a tethering mechanism through protein-protein interactions with other transcription factors, such as AP1, Sp1, CEBP $\beta$ , NF- $\kappa$ B or RUNX1 bound to their DNA binding site<sup>68</sup>. Some of these DNA motifs were enriched within ERBSs of both MCF7 subtypes and in particular remained present within ERBSs of untreated MKL1 $\Delta$ N200 MCF7 cells. Albeit no clear studies have specifically addressed this point, it is generally admitted that these protein-protein interactions mainly involve the monomeric form of ER $\alpha$ . In contrast, dimer formation is thought to be essential for coactivator recruitment by ER $\alpha$  as suggested by Florescence resonance energy transfer (FRET)-based approaches or recent cryoelectron microscopy studies<sup>50,69,70</sup>. Nevertheless, while the receptor interacting domain (RIDs) of the SRC/P160 family of coactivators have the highest affinity for the dimeric form of ER $\alpha$ , FRET experiments also indicated that high RIDs concentration associated with low ER $\alpha$  amounts might favor a shift toward complexes with one ER $\alpha$  monomer<sup>69</sup>. The SRC/P160 family proteins are the primary coactivators recruited by DNA-bounded ER $\alpha$  which in turn recruit multiple secondary coactivators, such as CPB or P300, to form a minimal

receptor-coactivator complex that promotes chromatin remodeling through histone acetyltransferase activities<sup>70</sup>. Consequently, we performed PLA experiments to monitor the interaction of P160 family proteins with ER $\alpha$  in MCF7 cells expressing or not MKL1 $\Delta$ N200. Although the relevance of changes in ER $\alpha$  monomer/dimer equilibrium in the observed effects is difficult to establish, our data clearly show differences between both cell types. In particular, ER $\alpha$  interactions with SRC1 or SRC3 were E2-dependent in MKL1 $\Delta$ N200 MCF7 cells only, when SRC1/ER $\alpha$  complex formation was antagonized by ICI in both cell types. The absence of an E2-regulated P160 coactivator/ER $\alpha$  interaction in control MCF7 cells was unexpected. However, FRET- or BIAcore-based studies also described interactions between ER $\alpha$  and SRC/P160 coactivators in the absence of ligand, with E2 increasing their frequency and stability<sup>69,71</sup>. Thus, the presence of large amount of ER $\alpha$  homodimers in untreated cells might partially compensate the absence of E2 in the recruitment of SRC/P160 family members by ER $\alpha$ . Specific phosphorylation of ER $\alpha$  by growth factor signaling pathways in the absence of ligand can also strengthen P160 coactivator/ER $\alpha$  interactions<sup>55</sup>. Another surprising fact was the absence of correlation between ER $\alpha$  abundance and P160 coactivator/ER $\alpha$  interactions in E2-treated control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The phenomenon could be related to different antibody accessibilities in PLA experiments or to the fact that only a subpopulation of ER $\alpha$  is available to form complexes with SRC/P160 members, with variable abundance between control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells<sup>69</sup>. Lastly, the localization of the P160 coactivator/ER $\alpha$  interaction was also differing between both cell types. Indeed, restricted to the nuclear compartment in control MCF7 cells, the P160/ER $\alpha$  complexes were redistributed to the whole cell volume in MKL1 $\Delta$ N200 MCF7 cells, in agreement with the ER $\alpha$  relocation and a similar redistribution of SRC/p160 coactivators. Dynamic changes in subcellular distribution of SRC/P160 coactivators were previously described to be regulated by nucleo-cytoplasmic trafficking, phosphorylation or steroid receptor localization<sup>72,73</sup>. Although SRC/P160 protein recruitment by ER $\alpha$  appears to occur in the cytoplasm, the functional implications of these complexes remain to be defined.

Nuclear exclusion of ER $\alpha$  often promotes its non-nuclear signaling pathways. The receptor can then be addressed to the plasma membrane, particularly in the caveola rafts, where it physically interacts with multiple scaffold proteins and kinases<sup>55,56</sup>. Palmitoylation of ER $\alpha$  at cysteine 447 is a prerequisite step, required for caveolin-1 interaction and the resulting plasma membrane localization<sup>74,75</sup>. Of interest, palmitoylation occurs only on ER $\alpha$  monomers, the reaction being enhanced by a direct interaction of monomeric ER $\alpha$  with HSP27<sup>76</sup>. Therefore, a nuclear exclusion of ER $\alpha$  associated with high interactions with the chaperone HSP70 and an unbalanced ER $\alpha$  monomer/dimer equilibrium favoring the monomeric state should make MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells highly permissive to non-genomic action of ER $\alpha$ . Using PLA to monitor ER $\alpha$ /c-src and ER $\alpha$ /PI3K interactions in breast

cancers, we demonstrate that the expression of the constitutively active form of MKL1 indeed greatly enhances ER $\alpha$  complexes with non-genomic partners. Thus, our results reinforce the notion that non-genomic function of ER $\alpha$  is associated with resistance to endocrine therapy, poor prognosis and aggressive human breast cancers. However, we also observed discrepancies in our cell line model that question the perfect correlation between both types of processes. Indeed, high ER $\alpha$ /kinase complex formation unexpectedly occurred in the absence of E2. Downstream effectors such as ERK, AKT and H3S10, were also found to be highly phosphorylated in an E2-independent manner. Finally, both ER $\alpha$ /c-src interaction and effector phosphorylation were not antagonized by ICI in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. Higher ER $\alpha$ /c-src interaction and AKT phosphorylation were even observed after an ICI treatment. Although complex formation occurs between ER $\alpha$  and non-genomic partners, these data reveal significant changes in ER $\alpha$  non-nuclear functions in MCF7 cells expressing MKL1  $\Delta$ N200 protein. Enhancement of MAPK and AKT signaling pathways could be based on ER $\alpha$ -dependent mechanism in which the interplay between ER $\alpha$  and agonist and antagonist ligands is modified. However, we cannot also exclude the hypothesis that a non-functional stochastic interaction between ER $\alpha$  and non-genomic partners associated in parallel with an ER $\alpha$ -independent increase of MAPK and AKT signaling pathways is established in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells.

In conclusion, our study offers new mechanistic insights into ER $\alpha$  functional changes engaged during breast cancer progression particularly involving a transition from luminal to basal-like phenotype. Our work also implicates the targeting of the nuclear location of MKL1 as a potential therapeutic strategy for the treatment of endocrine-resistant and recurrent breast cancer.

## **Acknowledgments**

We thank the biosit Health genomics core facility of biogenouest genomics and the IGBMC Microarray and Sequencing platform at Illkirch. This work was supported by the University of Rennes 1, Inserm, CNRS, and the Ligue Contre le Cancer.

## References

1. Skibinski, A. & Kuperwasser, C. The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* **34**, 5309–5316 (2015).
2. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
3. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10869–10874 (2001).
4. Platet, N., Cathiard, A. M., Gleizes, M. & Garcia, M. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **51**, 55–67 (2004).
5. Dahlman-Wright, K. *et al.* International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 773–781 (2006).
6. Osborne, C. K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res. Treat.* **51**, 227–238 (1998).
7. Wickerham, D. L. *et al.* The use of tamoxifen and raloxifene for the prevention of breast cancer. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* **181**, 113–119 (2009).
8. Jordan, V. C. & O'Malley, B. W. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **25**, 5815–5824 (2007).
9. Clarke, R., Tyson, J. J. & Dixon, J. M. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. *Mol. Cell. Endocrinol.* **418 Pt 3**, 220–234 (2015).
10. Musgrove, E. A. & Sutherland, R. L. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 631–643 (2009).
11. Gajulapalli, V. N. R., Malisetty, V. L., Chitta, S. K. & Manavathi, B. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci. Rep.* **36**, (2016).
12. Carroll, J. S. *et al.* Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat. Genet.* **38**, 1289–1297 (2006).
13. Welboren, W.-J. *et al.* ChIP-Seq of ERalpha and RNA polymerase II defines genes differentially responding to ligands. *EMBO J.* **28**, 1418–1428 (2009).
14. Ross-Innes, C. S. *et al.* Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* **481**, 389–393 (2012).
15. Jozwik, K. M. & Carroll, J. S. Pioneer factors in hormone-dependent cancers. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 381–385 (2012).
16. Badve, S. *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **24**, 157–167 (2011).
17. Lim, E. *et al.* Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat. Med.* **15**, 907–913 (2009).
18. Molyneux, G. *et al.* BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* **7**, 403–417 (2010).
19. Tornillo, G. & Smalley, M. J. ERrrr...where are the progenitors? Hormone receptors and mammary cell heterogeneity. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **20**, 63–73 (2015).
20. Kuukasjärvi, T., Kononen, J., Helin, H., Holli, K. & Isola, J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **14**, 2584–2589 (1996).
21. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329–342 (2003).
22. Pipes, G. C. T., Creemers, E. E. & Olson, E. N. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* **20**, 1545–1556 (2006).
23. Medjkane, S., Perez-Sanchez, C., Gaggioli, C., Sahai, E. & Treisman, R. Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 257–268 (2009).



24. Purrington, K. S. *et al.* Genome-wide association study identifies 25 known breast cancer susceptibility loci as risk factors for triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* **35**, 1012–1019 (2014).
25. Gurbuz, I., Ferralli, J., Roloff, T., Chiquet-Ehrismann, R. & Asparuhova, M. B. SAP domain-dependent Mkl1 signaling stimulates proliferation and cell migration by induction of a distinct gene set indicative of poor prognosis in breast cancer patients. *Mol. Cancer* **13**, 22 (2014).
26. Lindström, S. *et al.* Genome-wide association study identifies multiple loci associated with both mammographic density and breast cancer risk. *Nat. Commun.* **5**, 5303 (2014).
27. Kerdivel, G. *et al.* Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* **390**, 34–44 (2014).
28. Flouriot, G. *et al.* The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications. *Biochem. J.* **461**, 257–268 (2014).
29. Gentleman, R. C. *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5**, R80 (2004).
30. Wettenhall, J. M. & Smyth, G. K. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **20**, 3705–3706 (2004).
31. Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y. & He, Q.-Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).
32. Quintin, J. *et al.* Dynamic estrogen receptor interactomes control estrogen-responsive trefoil Factor (TFF) locus cell-specific activities. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 2418–2436 (2014).
33. Palierne, G. *et al.* Changes in Gene Expression and Estrogen Receptor Cistrome in Mouse Liver Upon Acute E2 Treatment. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **30**, 709–732 (2016).
34. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S. L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* **10**, R25 (2009).
35. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **25**, 2078–2079 (2009).
36. Feng, J., Liu, T., Qin, B., Zhang, Y. & Liu, X. S. Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat. Protoc.* **7**, 1728–1740 (2012).
37. Liu, T. *et al.* Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biol.* **12**, R83 (2011).
38. Barrett, T. *et al.* NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res.* **37**, D885–890 (2009).
39. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 178–196 (2014).
40. Stadler, S. C. & Allis, C. D. Linking epithelial-to-mesenchymal-transition and epigenetic modifications. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 404–410 (2012).
41. Tam, W. L. & Weinberg, R. A. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* **19**, 1438–1449 (2013).
42. Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8418–8423 (2003).
43. Ray, P. S. *et al.* FOXC1 is a potential prognostic biomarker with functional significance in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 3870–3876 (2010).
44. Frasor, J. *et al.* Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* **144**, 4562–4574 (2003).
45. Ovaska, K. *et al.* Integrative analysis of deep sequencing data identifies estrogen receptor early response genes and links ATAD3B to poor survival in breast cancer. *PLoS Comput. Biol.* **9**, e1003100 (2013).
46. Fullwood, M. J. *et al.* An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. *Nature* **462**, 58–64 (2009).
47. McLean, C. Y. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat.*

- Biotechnol.* **28**, 495–501 (2010).
48. Calo, E. & Wysocka, J. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol. Cell* **49**, 825–837 (2013).
  49. Notides, A. C., Lerner, N. & Hamilton, D. E. Positive cooperativity of the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4926–4930 (1981).
  50. Tamrazi, A., Carlson, K. E., Daniels, J. R., Hurth, K. M. & Katzenellenbogen, J. A. Estrogen receptor dimerization: ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **16**, 2706–2719 (2002).
  51. Padron, A., Li, L., Kofoed, E. M. & Schaufele, F. Ligand-selective interdomain conformations of estrogen receptor- $\alpha$ . *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **21**, 49–61 (2007).
  52. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* **18**, 306–360 (1997).
  53. Dhamad, A. E., Zhou, Z., Zhou, J. & Du, Y. Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) and Biochemical Characterization of the ER $\alpha$ -Hsp70 Interaction. *PLoS One* **11**, e0160312 (2016).
  54. McKenna, N. J. & O'Malley, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465–474 (2002).
  55. Arnal, J.-F. *et al.* Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol. Rev.* **97**, 1045–1087 (2017).
  56. Edwards, D. P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 335–376 (2005).
  57. Reyes, D. *et al.* Activation of mitogen- and stress-activated kinase 1 is required for proliferation of breast cancer cells in response to estrogens or progestins. *Oncogene* **33**, 1570–1580 (2014).
  58. Poulard, C. *et al.* Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol. Med.* **4**, 1200–1213 (2012).
  59. Huet, G. *et al.* Repression of the estrogen receptor- $\alpha$  transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 33729–33739 (2009).
  60. Li, S., Chang, S., Qi, X., Richardson, J. A. & Olson, E. N. Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5797–5808 (2006).
  61. Sun, Y. *et al.* Acute myeloid leukemia-associated Mkl1 (Mrtf-a) is a key regulator of mammary gland function. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5809–5826 (2006).
  62. Sizemore, G. M. *et al.* FOXC1 is enriched in the mammary luminal progenitor population, but is not necessary for mouse mammary ductal morphogenesis. *Biol. Reprod.* **89**, 10 (2013).
  63. Yu-Rice, Y. *et al.* FOXC1 is involved in ER $\alpha$  silencing by counteracting GATA3 binding and is implicated in endocrine resistance. *Oncogene* **35**, 5400–5411 (2016).
  64. Tkocz, D. *et al.* BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene* **31**, 3667–3678 (2012).
  65. McBryan, J., Howlin, J., Napoletano, S. & Martin, F. Amphiregulin: role in mammary gland development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **13**, 159–169 (2008).
  66. Luker, K. E. & Luker, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.* **238**, 30–41 (2006).
  67. Jordan, V. C., Curpan, R. & Maximov, P. Y. Estrogen receptor mutations found in breast cancer metastases integrated with the molecular pharmacology of selective ER modulators. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, djv075 (2015).
  68. Stender, J. D. *et al.* Genome-wide analysis of estrogen receptor alpha DNA binding and tethering mechanisms identifies Runx1 as a novel tethering factor in receptor-mediated transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3943–3955 (2010).
  69. Kofoed, E. M., Guerbodot, M. & Schaufele, F. Structure, affinity, and availability of estrogen receptor complexes in the cellular environment. *J. Biol. Chem.* **285**, 2428–2437 (2010).
  70. Yi, P. *et al.* Structure of a biologically active estrogen receptor-coactivator complex on DNA. *Mol. Cell* **57**, 1047–1058 (2015).

71. Cheskis, B. J. *et al.* Hierarchical affinities and a bipartite interaction model for estrogen receptor isoforms and full-length steroid receptor coactivator (SRC/p160) family members. *J. Biol. Chem.* **278**, 13271–13277 (2003).
72. Amazit, L. *et al.* Subcellular localization and mechanisms of nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 32195–32203 (2003).
73. Amazit, L. *et al.* Regulation of SRC-3 intercompartmental dynamics by estrogen receptor and phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6913–6932 (2007).
74. Acconcia, F. *et al.* Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol. Biol. Cell* **16**, 231–237 (2005).
75. Pedram, A. *et al.* A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **282**, 22278–22288 (2007).
76. Razandi, M., Pedram, A. & Levin, E. R. Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3249–3261 (2010).

## Figures Legends

### Figure 1. Expression of MKL1 ΔN200 in MCF7 induces the transition from a luminal to a basal-like phenotype.

The transcriptional profiles of control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells were compared through microarray analysis. **A**, Enriched Kegg pathways in our dataset and the differentially expressed genes [showing  $P < 0.01$  and  $\text{abs}(\text{FC}) > 4$ ] which are included in them are shown. Genes are colored according to their  $\log_2\text{FC}$  expression values. **B**, Boxplot of the  $\log_2\text{FC}$  expression values obtained in the microarray experiment for basal, luminal and HER2 breast cancer type signature genes according to Perou *et al.*<sup>2</sup> and Sorlie *et al.*<sup>3,42</sup>. **C**, Immunofluorescence images of MKL1, ER $\alpha$ , GATA3, FOXA1 and FOXC1 after 48 hours of tetracycline treatment of control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells. Densitometry quantification of the immunofluorescence images expressed as percentage of the intensity measured in control MCF7 cells is shown on the left side of the panel. Error bars represent SEM (n ranges from 10 to 20;  $P < 0.01$ ).

### Figure 2. E2 modulation of transcription is abrogated in MKL1 ΔN200 MCF7 cells.

E2-regulated genes were explored in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells through microarray analysis. Cells were treated for 4h with 10 nM E2 or EtOH as a control. **A**, Venn diagram of E2-regulated genes [showing  $P < 0.05$  and  $\text{abs}(\text{FC}) > 1.8$ ] in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells. **B**, The 225 E2-regulated genes were classified into 6 clusters (C1 to C6) according to the variations in their basal activity in MKL1 ΔN200 MCF7 cells. Box plots represent the average expression level of the genes for each category in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cells, treated or not with E2. **C**, For the 109 genes

that lose their response to E2 and presented significant variations in their basal activity in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, we represented their changes in expression against their fold change in expression by E2 in control cells (C1-C4).

**Figure 3. ER $\alpha$  cistrome is affected by the expression of MKL1  $\Delta$ N200 protein in MCF7 cells.**

**A-D**, Venn diagrams summarizing the overlaps of genomic regions bound by ER $\alpha$  in control MCF7 cells or MCF7 cells expressing the MKL1  $\Delta$ N200 following a 50 min treatment with E2 or ethanol (EtOH) as vehicle control, as determined from ChIP-seq experiments. **E-H**, The ER $\alpha$  ChIP-seq signals were aligned and averaged within a -2.5/+2.5 kbp window centered on ERBSs belonging to categories illustrated in the Venns on upper panels. In **G**, NA stands for non-applicable, since only one ERBS is common between the ER $\alpha$  cistromes determined in the two cell lines in the absence of E2. **I**, Hierarchical clustering of the % of overlap of ER $\alpha$  cistromes in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells with the binding sites of other transcription factors or enriched region of histone marks previously determined in MCF-7 cells (see Supplementary Table S4). **J**, To correlate this change of ER $\alpha$  cistrome and our transcriptome analysis, we first identified the closest ERBSs from the TSSs of the 223 genes that were not anymore regulated by E2 in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7, present in either control or MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. We used the categories defined previously in Figure 2. The stacked histogram shown illustrates the % of overlap between these ERBSs. **K**, Graphs representing the mean ChIP-seq signal obtained at the center of the ERBSs located at the vicinity of the TSSs of categorized genes in the different cells and conditions. The graph on the top represents values obtained on ERBSs which are common in control and or MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The histogram at the bottom is shown as a control, illustrating the mean values on the ERBSs that disappeared upon expression of the MKL1  $\Delta$ N200 protein.

**Figure 4. Chromatin status of ERBSs in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells.**

**A**, Heatmap summarizing data obtained in ChIP-qPCR experiments that evaluated ER $\alpha$  recruitment and H3K4me2 and H3K27ac enrichments on 7 genomic regions bound by ER $\alpha$  in both control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells as well as on 4 lost and 4 gained ERBSs in MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. Amongst the common ERBSs, we evaluated ER $\alpha$  binding and chromatin modifications occurring at regions located within the promoter of the model estrogen-responsive *GREB1* gene (*GREB1* p) and two enhancers regulating *GPR68A* or *IFITMA* genes. Cells were treated for 50 min with 10 nM E2 or EtOH as a control. Data shown are mean of relative enrichment ( $n=5$ ) normalized to an internal control

(*CXCL12* intron). **B**, For each ERBS, values were expressed in fold increase above the level measured in untreated control MCF7 cells and an average  $\pm$  SEM was then made for each category of ERBSs.

**Figure 5. Expression of MKL1  $\Delta$ N200 in MCF7 impacts ER $\alpha$  subcellular localization and the monomer/dimer equilibrium.**

**A**, Shown are pictures of immunofluorescent detection of the subcellular localization of ER $\alpha$  in control MCF7 and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. The bar chart represents the fluorescence intensity as measured through densitometry quantification, expressed as a percentage of the intensity measured in control MCF7 cells. The respective proportion of ER $\alpha$  nuclear and cytoplasmic staining is indicated. Error bars represent SEM (n = 10 to 15; P<0.01). **B**, Scatchard analysis of the specific [ $^3$ H] estradiol binding was performed as described in the materials and methods on whole cell extracts prepared from control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated 48 hours with tetracycline. The specific equilibrium binding and the Scatchard plot analysis are shown, with a  $K_d$  of 0.4 nM for both cell types. Values represent the average of 3 independent experiments. **C**, ER $\alpha$  dimer complexes were detected by PLA in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 10 nM E2 during 60 min. PLA was performed using an ER $\alpha$  monoclonal antibody (sp1) directly conjugated to the PLA MINUS and PLUS oligonucleotides. The detected dimers are visible as red dots. Quantification of the number of dots/cell and dots/nucleus was performed using ImageJ software. The respective proportion of dimer/dots in the nucleus and in the cytoplasm is shown. Values represent the mean  $\pm$  SEM. Columns with different superscripts differ significantly (n = 60; P<0.05). **D**, ER $\alpha$ /HSP70 interactions were detected by PLA in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 10 nM E2 during 60 min. The respective proportion of dots in the nucleus and in the cytoplasm is shown. Values represent the mean  $\pm$  SEM. Columns with different superscripts differ significantly (n = 30; P<0.05).

**Figure 6. Expression of MKL1  $\Delta$ N200 protein in MCF7 cells impacts the dynamic interaction of ER $\alpha$  with coactivators from the P160 family.**

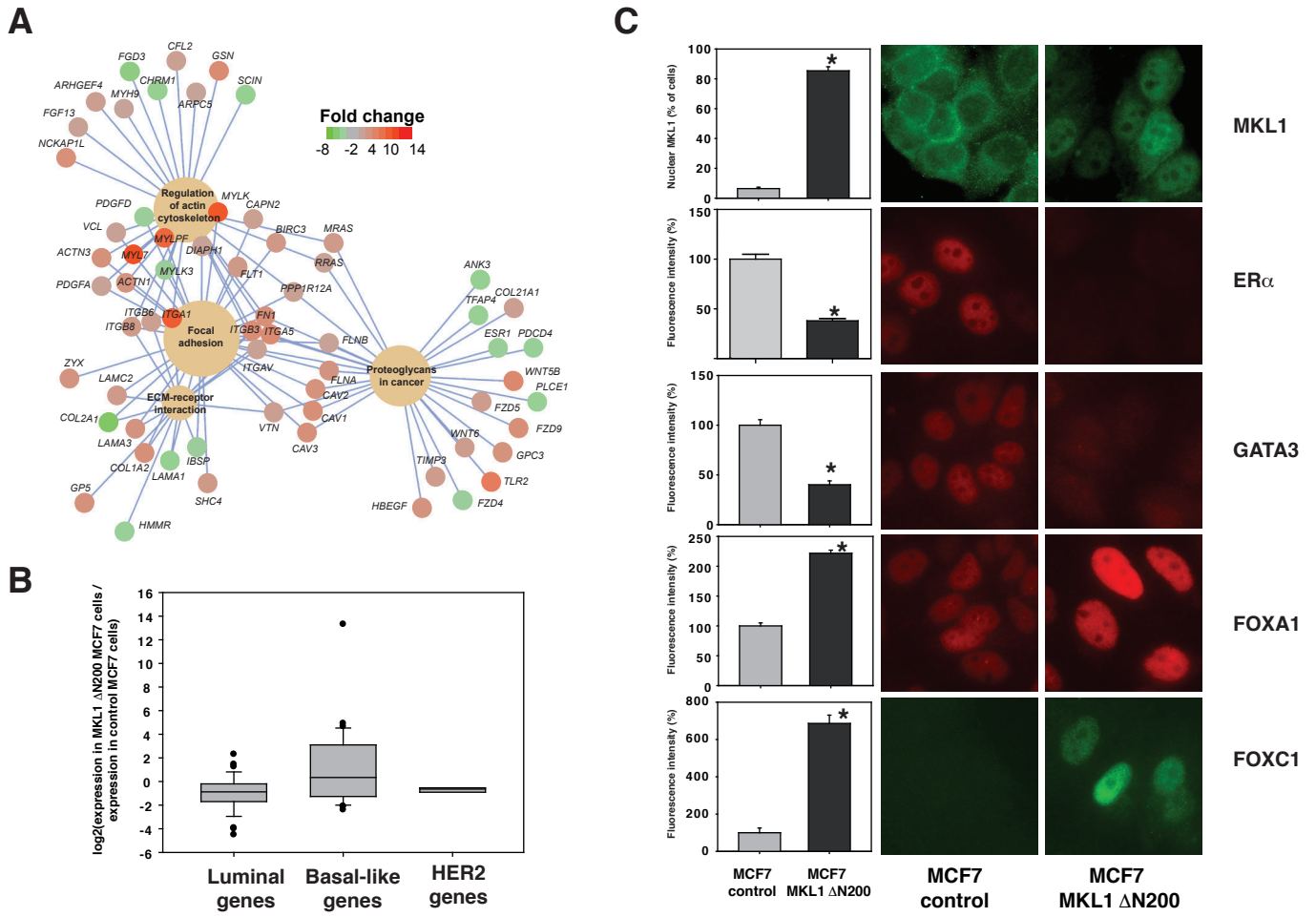
**A**, Pictures illustrating the colocalization of ER $\alpha$  and SRC1 in control MCF7 cells as determined by immunofluorescent detection experiments. **B**, The subcellular localization of SRC1 and SRC3 in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells was determined using immunofluorescent detection. Representative pictures of these experiments are shown, and were used to measure the signal intensity by densitometry quantification. Mean values shown within the graph are expressed as a percentage of the intensity measured in control MCF7 cells. The respective proportion of nuclear and cytoplasmic staining of the P160 coactivators is indicated. Error bars represent SEM (n = 15 to 20;

P<0.01). **C**, ER $\alpha$ /P160 coactivator complexes were detected by PLA in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 10 nM E2 during 60 min. PLA was performed using ER $\alpha$ , SRC1 and SRC3 specific antibodies. Quantification of the number of dots/cell and dots/nucleus was performed using ImageJ software. The respective proportion of complex/dots in the nucleus and in the cytoplasm is shown. Values represent the mean +/- SEM. Columns with different superscripts differ significantly (n = 30 to 40; P<0.05).

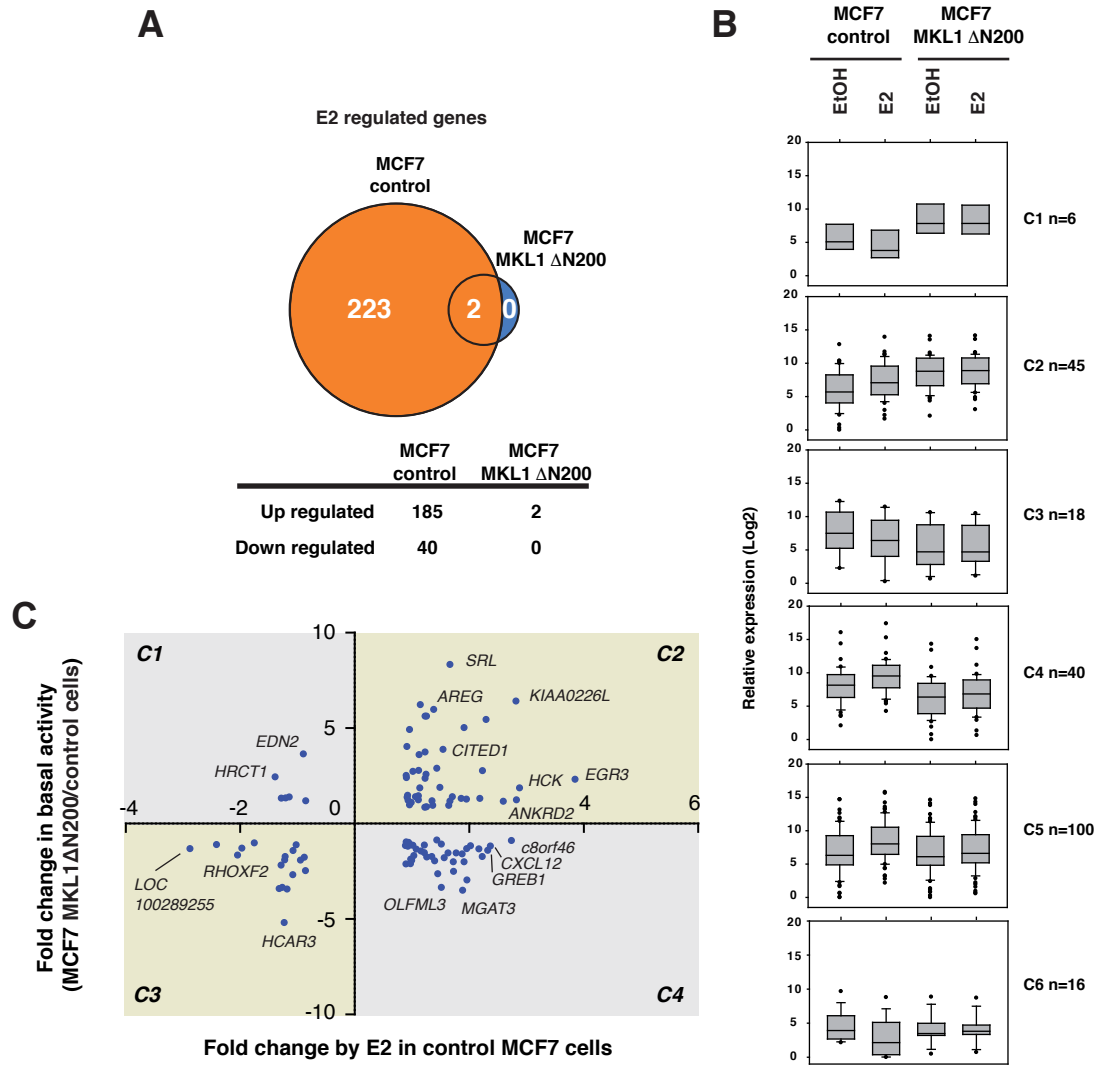
**Figure 7. Expression of MKL1  $\Delta$ N200 protein in MCF7 impacts the dynamic of ER $\alpha$  interaction with kinases.**

**A**, ER $\alpha$ /src, ER $\alpha$ /PI3K and ER $\alpha$ /MSK1 interactions were detected by PLA in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 10 nM E2 during 5 min. Representative pictures are shown at the top of the panel, and the quantification of the number of dots/cell performed using ImageJ software is shown at the bottom. Values represent the mean +/- SEM. Columns with different superscripts differ significantly (n = 15 to 50; P<0.05). **B**, Western blot analysis of ERK and AKT expression and phosphorylation (pERK and pAKT) levels in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells. Cells were treated with 10 nM E2, 100 nM ICI or vehicle for 24h. **C**, Immunofluorescence images of H3S10p in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells after 24h treatment with 10 nM E2 or vehicle. Densitometry quantification of the immunofluorescence images was performed and expressed as a percentage of the intensity measured in untreated control MCF7 cells. Values represent the mean +/- SEM. Columns with different superscripts differ significantly (n = 15; P<0.05).

# Figure 1

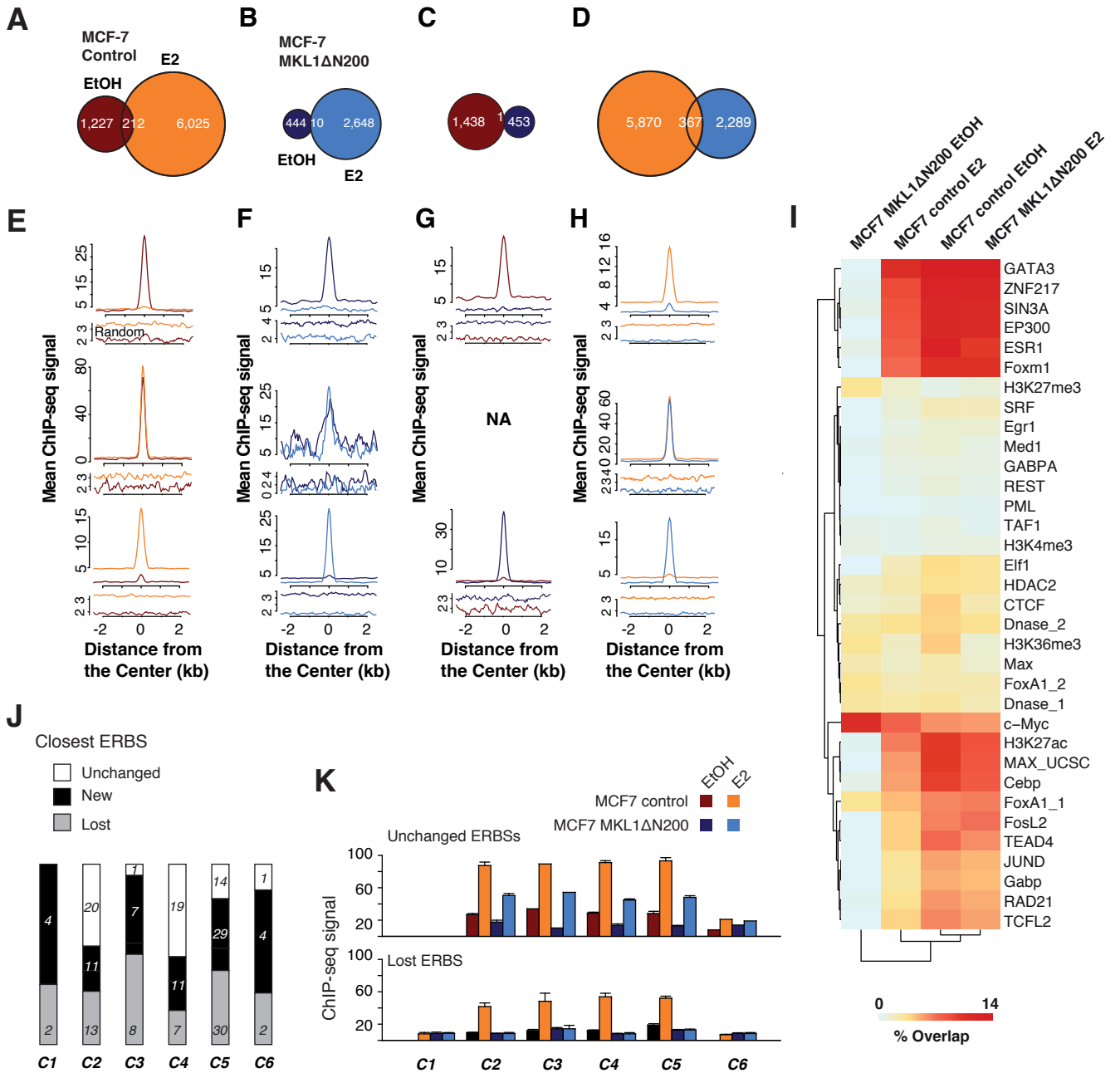


# Figure 2

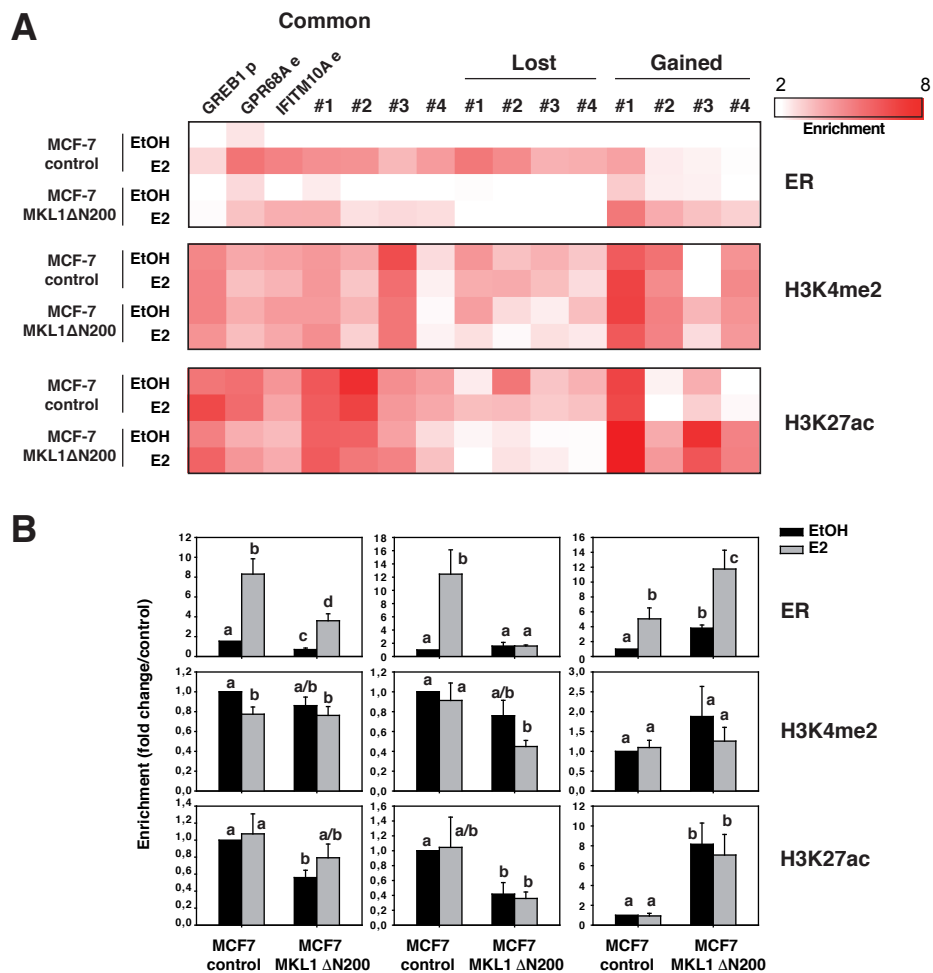




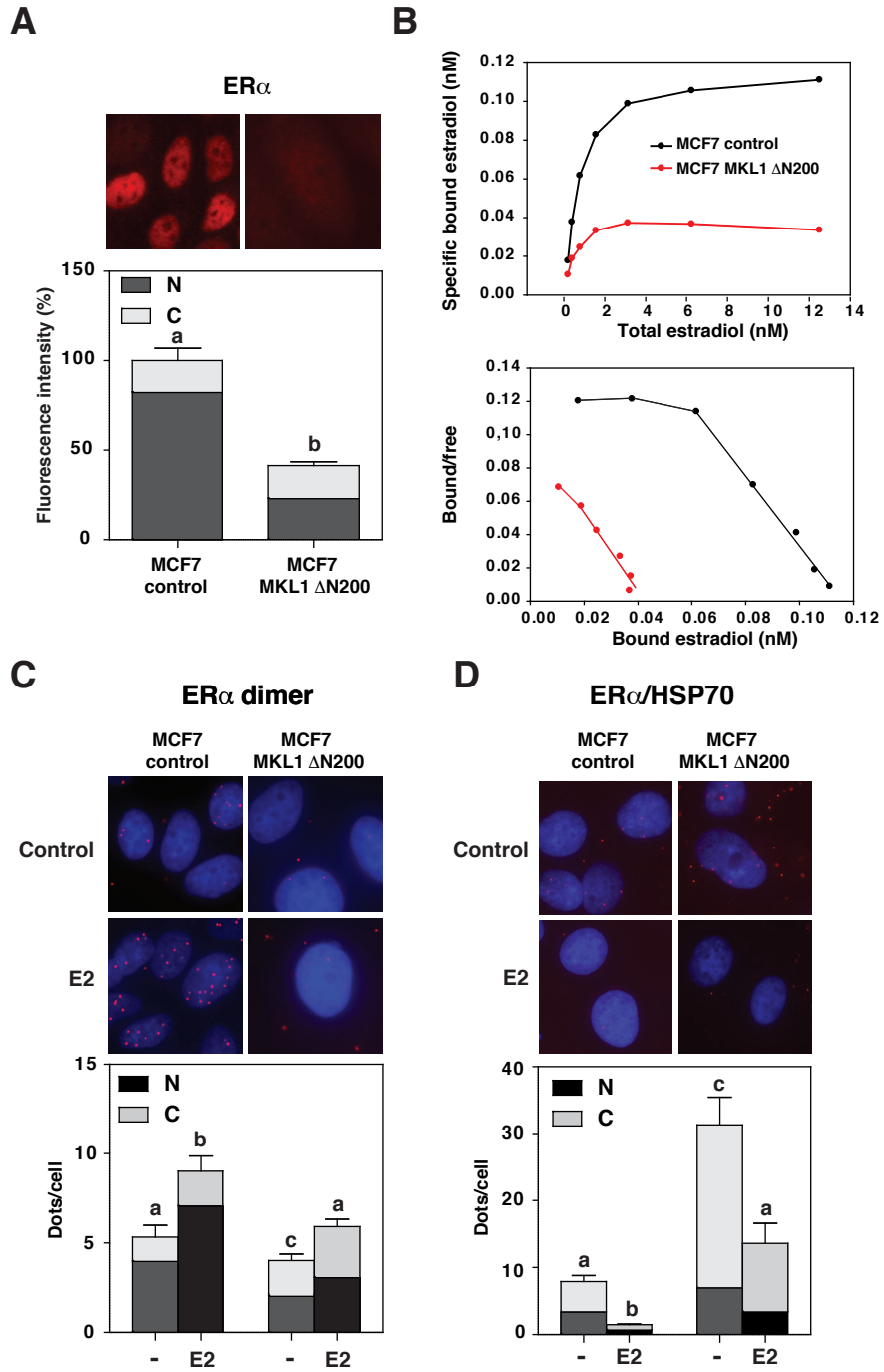
# Figure 3



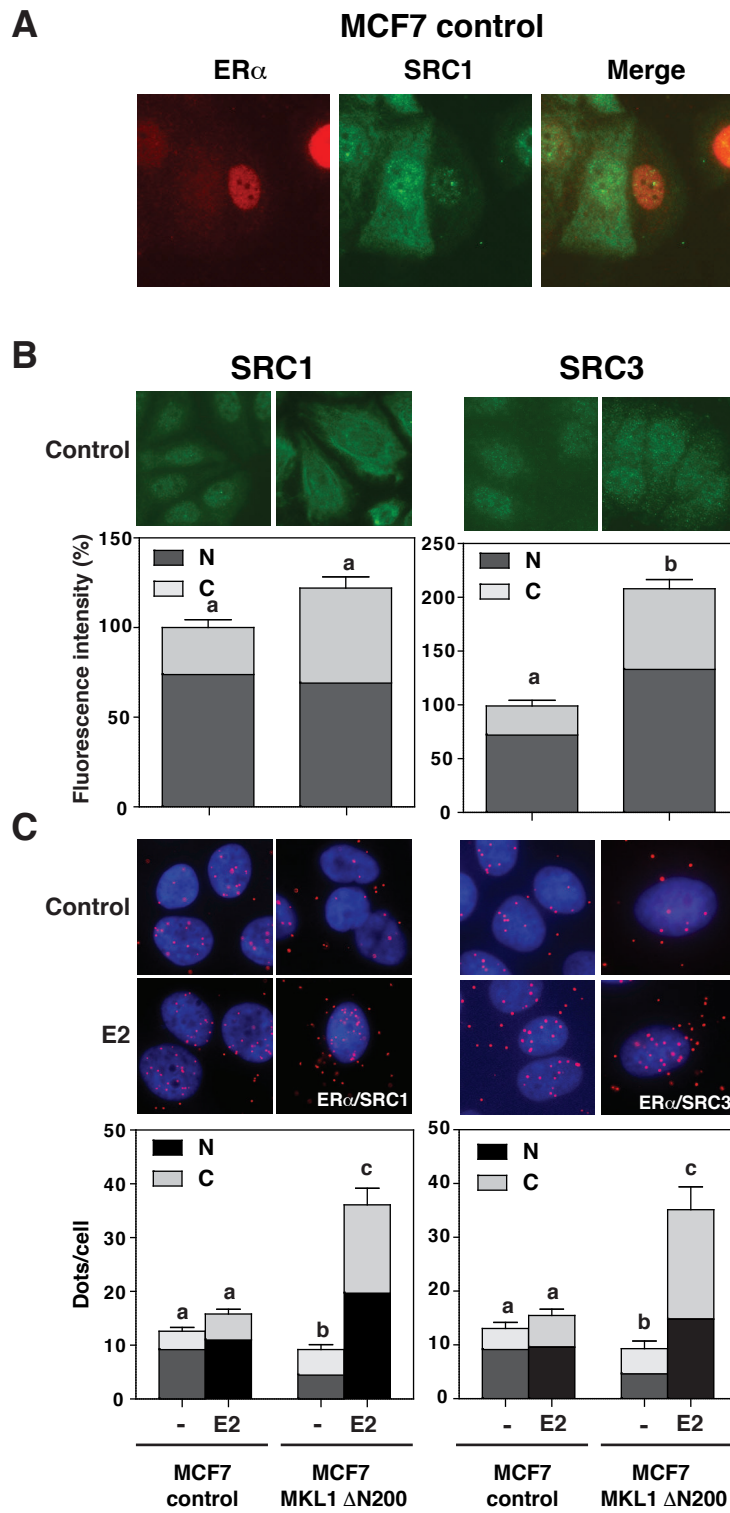
# Figure 4



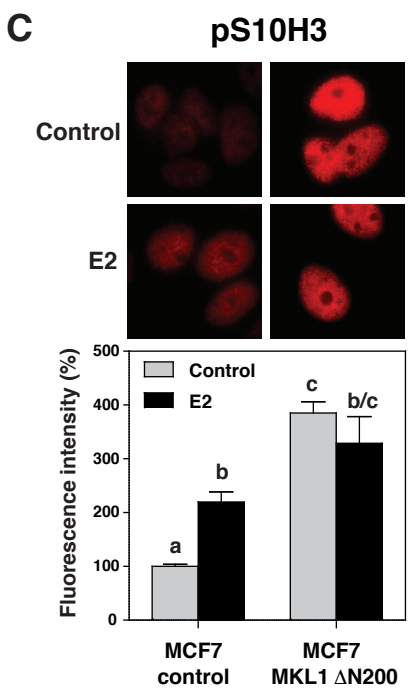
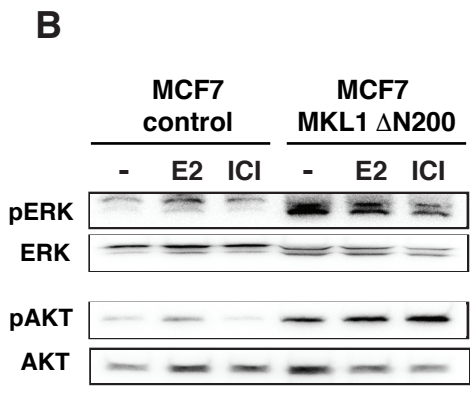
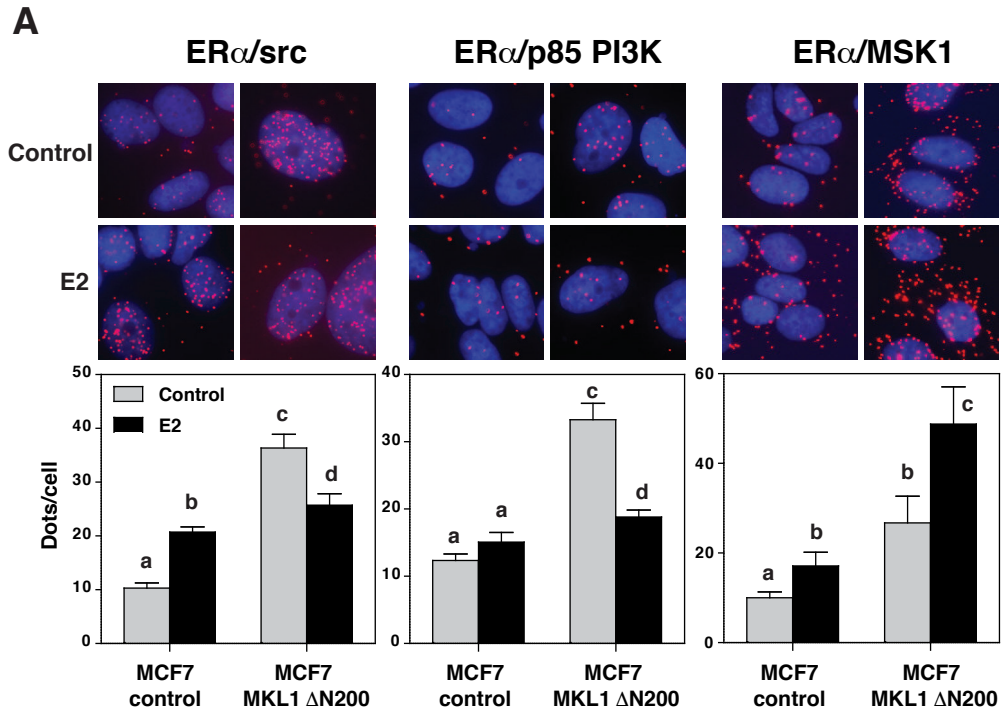
# Figure 5



# Figure 6

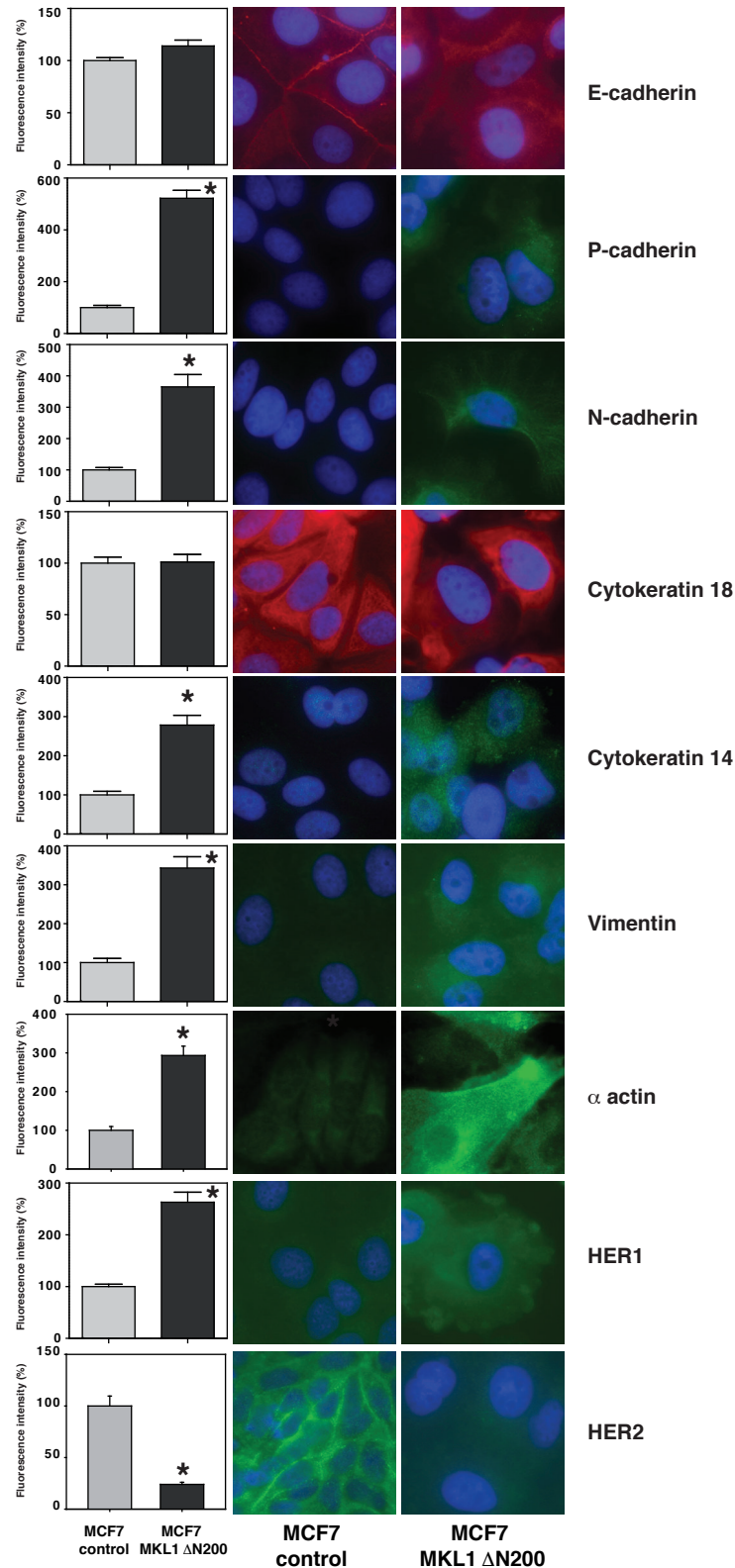


# Figure 7



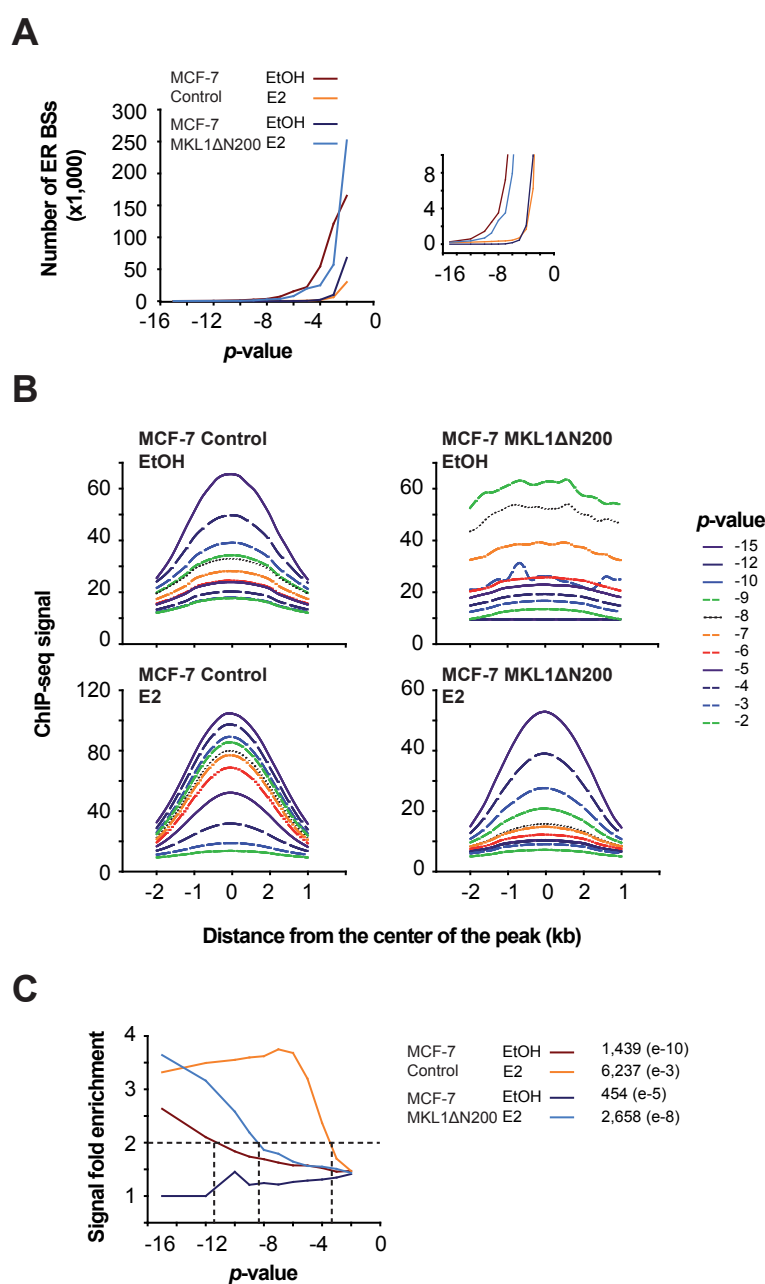
**Table 1. DNA motifs enriched within ERBSs.** Motif analysis was performed using SeqPos program from the cistrome platform (<http://cistrome.org/ap/>) and the CentDist algorithm (<http://biogpu.ddns.comp.nus.edu.sg/~chipseq/webseqtools2>). Shown here are the Top50 motifs identified by either program. Enrichments were declared as being significant when the Z-score>2.5 or when the associated p-value<0.05 for the SeqPos or CentDist programs, respectively. Full analysis is provided within Supplementary File2.

MCF7 Control				MCF7 ΔN200			
EtOH		E2		EtOH		E2	
SeqPos Motif	CentDist Family	SeqPos Motif	CentDist Family	SeqPos Motif	CentDist Family	SeqPos Motif	CentDist Family
ESR1	ERE	ESR1	ERE	Tcfap2a	BACH	Esr1	ERE
ESR2	EBOX	ESR2	AP1	HES1	AP1	ESR2	AP1
PPARG	AP4	PPARG	AP4	TFCP2	MEIS1	PPARG	BACH
PPARG::RXRA	HEN	PPARG::RXRA	CREB	E2F1::TFDP1	STAT	PPARG::RXRA	NRF
Tbx3	AP2	Nr1H4	EBOX	SP2	EBOX	Nr1d2	MAF
E2F6	MINI	Nr1d2	SP1	TP73	ETS	Nr1H4	PTF1BETA
Tcfap2a	SP1	PPARA	CACCC	GTF2IRD1	SOX	Nr1d1	SMAD
ZIC3	WT1	Nr2F1	CACCT	KLF12	ERE	RORB	SP1
HINFP1	CACCC	Rxra	MAF	TFAP2A	AR	Rxra	AR
TFAP2B	PAX	NROB1	HEN	ZIC2	MAF	AR	SREB/EBOX
Zfx	ZNF219	RORB	DBP	MAX	CAP	Esrrb	FAC1
NR1H4	EGR	Esrrb	PAX	Creb3l2	CEBP	Nr2F1	FOX
Nr2F1	CREB	Nr2f2	TEF	Hic1	HSF	NROB1	ETS
UBP1	SMAD	Nr1d1	AP2	Zic3	NRF	ESRRA	AP4
TFAP2A	LRF	RARA	RFX	E2f4	CAAT	Nr2f2	MEF3
PPARA	HIC1	ESRRA	SMAD	E2F1	IRF	PPARA	LMAF
ZBTB7A	CP2	Nr5a2	TGTGGT	E2F1::TFDP2	P53	NR3C1	HEN
Nr1d2	ZID	Rarg	LMAF	Tcfcp2l1	BRN2	RARA	TFIII
ZBTB7B	LMAF	ATF6	MEF3	HINFP1	DMRT	NR4A1	SRF
Tcfap2e	TFIII	VDR	CP2	Zfp423	LEF	NR6A1	MYOGNF1
INSM1	GLI	THRB	MYB	TFEB	GATA	RORA	CACCT
EGR2	GCM	TFAP2B	MIF1	GCM1	GF1	PAX6	PAX
ZNF219	ROAZ	NR4A1	TFIII	CNTN2::CREB1	HELIOS	RARG	OLF1
WT1	SP3	Rxrg	NRF	CTCF	NFKB	NR3C2	RREB
RORB	LRH1	NEUROD1	BACH	MAFF		FLI1	EBOX
E2F1	AR	AR	BEL1	E2f3		RREB1	XPF1
TEAD2	P300	PAX2	P53	TFAP2B		THRB	BLIMP1
Zscan10	MAF	HNf4A	MTF1	NFIB		ZNF217	STAF
ZIC4	OLF1	NFE2L2	CAAT	Tcfap2c		NR4A2	LRH1
SP2	ARP1	SF1	NFKB	MYC		RXRb	DBP
NHLH1	SZF11	ZBTB49	SPZ	ATF3		Rxrg	GLI
Zfp161	TGTGGT	REST	ETS	SMAD4		ATF6	IRF
Esrrb	ETS	Snai1	FXR	HEY2		PGR	VMAF
EGR1	RREB	ZNF263	EBF	HEY1		E4F1	POLYA
ZIC2	NRF	HINFP1	LRH1	ZNF350		SMAD4	NF1
TFAP2C	MOV0	PAX5	STAF	TFEC		TFAP2B	MZF1
ZIC1	VMAF	Tbx3	GLI	GCM2		Nr5a2	SREB
E2f4	SPZ	Tcfap2b	GGG	ZIC1		ESRRG	STAT
Rxra	AP1	Tcfcp2l1	HES	PLAG1		JUNB	P300
TCF12	HES	NR3C1	XPF1	HES5		Nr2f6	MINI
Tcfcp2l1	EBF	Tcfap2a	PBX	BHLHE41		ZBTB49	GCM
Nr1d1	DBP	ATF3	GCM	Tcfap2e		Rfx1	NFKB
Ctcf	SREB	NR4A2	P300	Mycn		SFPI1	CREB
E2F2	CAAT	RORA	AR	TFE3		EGR3	AP2
Tcfap2c	AHR	GABPB1	SREB/EBOX	BHLHB3		Foxa1	TAACC
EGR3	NFKB	CTCF	BLIMP1	E2F2		ATF5	CACCC
PAX5	DEC	NR6A1	ZID	FOXB1		RUNX2	CEBP
Rarg	CACCT	PKNOX2	BRCA	PAX2		Tcf7	TEF
NR1H3	SREB/EBOX	XBP1	NF1	HIC2		Jund	TGTGGT
SP3		Tbx21	MINI	SMAD3		ATF2	SPZ



**Figure S1. Expression of MKL1ΔN200 protein in MCF7 cells induces changes in the expression of luminal-, basal-like- and HER2-breast cancer markers**

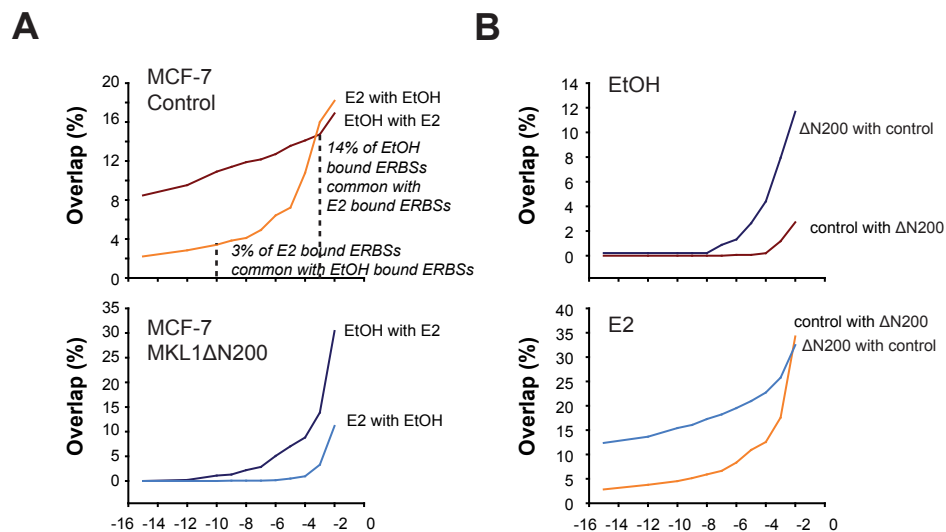
The amounts of E-cadherin, P-cadherin, N-cadherin, cytokeratin 18, cytokeratin 14, vimentin, alpha actin, HER1 and HER2 proteins were evaluated by immunofluorescent staining in control and MKL1 ΔN200 MCF7 cell after 48 hours of tetracycline treatment to induce the production of the MKL1 variant protein. The nuclei were counterstained with DAPI. Representative pictures of these experiments are shown on the right side of the figure, alongside with the densitometry quantification of the detected immunofluorescence signal on the left. Error bars represent SEM (n = 10 to 20; P<0.01).



**Figure S2. Determination of specific ER $\alpha$  cistromes.**

**A**, MACS2 algorithm was used to identify ER $\alpha$  enriched regions (ERBSs) in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with E2 and induced by 48h tetracycline, using different P-values as threshold of significance. The number of ERBSs identified is shown here as a function of the P-value used. A zoom of the graph is depicted at the right of the panel. **B**, Graph representing the mean ChIP-seq signal observed on the different sets of ERBSs determined in **A**. **C**, The mean signal determined on all sets of ERBSs identified in at each P-value was normalized to background signals measured at -3kb from the center of each ERBS. These normalized values indicate the mean fold enrichment of identified ERBSs in ER $\alpha$ . To consider a maximum of high-confidence ERBSs, we used ER $\alpha$  cistromes exhibiting a 2-fold enrichment when possible. For the ERBSs determined in EtOH-treated MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells, we used the set of ERBSs identified at  $1e-5$  P-value for which the best signal/noise ratio was attained with a reasonable number of genomic regions. The number of such ERBSs is given for each condition in the legend on the right side of the panel.

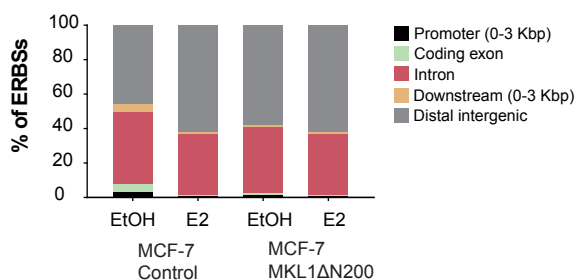




### Figure S3. Overlaps of ER $\alpha$ cistromes

Graphs represent the % of overlap between the ERBSs determined in one condition at fixed P-values (as determined from Figure S2) with those identified at increasing P-values from the other set of ERBSs. In **A**, the comparison is made between ER $\alpha$  cistromes determined minus or plus hormone in either control MCF7 cells or cells expressing the MKL1  $\Delta$ N200 protein. For instance, in the graph at the top of the panel, the red curve represents the % of ERBSs determined in the EtOH condition (at a P-value of  $1e-10$ ) that overlaps with sets of BSs bound by ER $\alpha$  identified in the presence of E2 using different P-values. Dashed lines indicate the % of overlaps obtained using the "optimal" p-values for each sets. These overlaps correspond to those illustrated in the Venn diagrams of the Figure 3. In **B**, the overlap was calculated between ERBSs identified in either cell lines in the presence or absence of hormone.

**A**

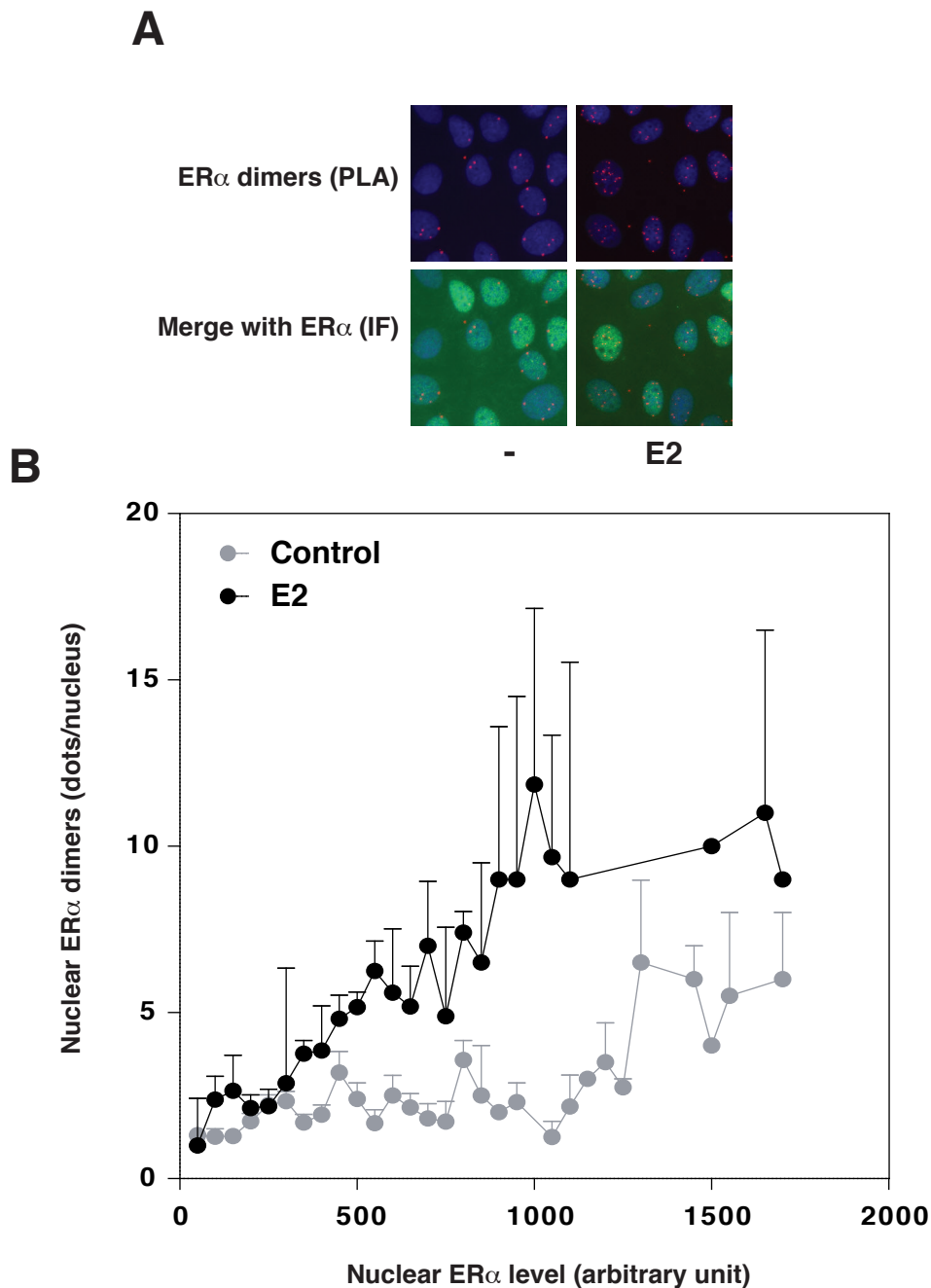


**B**

	p-val	Annotations of genes associated with ERBSs subsets
MCF-7 Control EtOH	2.8e-5	up-regulated in DLD1 cells (colon carcinoma) over-expressing LEF1
	3.1e-4	down-regulated in HUVEC cells (endothelium) by treatment with PIGF
	1.2e-3	up-regulated in small intestine in PRKCA knockout mice
	1.7e-3	down-regulated by everolimus in mouse prostate tissue transgenically expressing human AKT1
	3.6e-3	up-regulated in A549 lung carcinoma and M059K glioblastoma cells treated with dichloroacetate
	3.7e-3	up-regulated in retina cells from NRL knockout mice.
	3.8e-3	up-regulated in retina cells from CRX and NRL double knockout mice
	5.6e-3	down-regulated in late serum response of CRL 2091 cells (foreskin fibroblasts)
	7.3e-3	down-regulated in epithelial breast cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	7.4e-3	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 stably over-expressing constitutively active MAP2K1
	7.8e-3	up-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) over-expressing CCND1
	8.0e-3	up-regulated in DAOY cells (medulloblastoma) upon knockdown of PCGF2
	8.5e-3	down-regulated by everolimus in prostate tissue
	1.0e-2	down-regulated in mouse prostate by transgenic expression of human AKT1
	1.1e-2	up-regulated in mouse prostate by transgenic expression of human AKT1
MCF-7 Control E2	4.0e-26	up-regulated in epithelial lung cancer cell lines over-expressing KRAS
	7.2e-22	up-regulated in neurons
	9.0e-19	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 stably over-expressing constitutively active MAP2K1
	2.1e-13	down-regulated in A549 lung carcinoma and M059K glioblastoma cells treated with dichloroacetate
	1.5e-12	up-regulated in granule cell neuron precursors (GCNPs) after stimulation with Shh for 24h
	3.8e-11	up-regulated in NOMO-1 cells after knockdown of STK33
	5.4e-10	up-regulated in astrocytes
	6.0e-10	up-regulated in myometrial cells over-expressing a shortened splice form of ATF2
	6.9e-10	up-regulated in HEK293 cells (kidney fibroblasts) upon knockdown of RELA
	1.0e-9	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 and engineered to express ligand-activatable ERBB2
	1.1-9	up-regulated in MEF cells (embryonic fibroblasts) with knockout of SNF5
	1.3e-9	up-regulated in Sez-4 cells (T lymphocyte) that were first starved of IL2 and then stimulated with IL2
	1.6e-9	up-regulated in HCT116 cells (colon carcinoma) upon knockdown of PTEN
	4.5e-9	up-regulated in epithelial breast cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	9.3e-9	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 stably over-expressing constitutively active RAF1
MCF-7 MKL1ΔN200 EtOH	8.1e-14	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	1.4e-9	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	1.2e-7	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	2.9e-7	up-regulated in epithelial lung cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	4.2e-7	up-regulated in epithelial lung cancer cell lines over-expressing KRAS
	1.9e-6	up-regulated in epithelial lung and breast cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	3.5e-5	up-regulated in epithelial lung and breast cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	1.2e-4	up-regulated in epithelial kidney cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	2.6e-4	up-regulated in NOMO-1 cells (AML) after knockdown of STK33
	3.5e-4	up-regulated in myometrial cells over-expressing a shortened splice form of ATF2
	7.2e-4	up-regulated in NOMO-1 and SKM-1 cells (AML) after knockdown of STK33
	9.6e-4	down-regulated in NCI-60 panel of cell lines with mutated TP53
	1.3e-3	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 and engineered to express ligand-activatable ERBB2
	2.0e-3	up-regulated in neurons.
	7.6e-3	down-regulated in MCF10A cells (breast cancer) upon knockdown of BRCA1
MCF-7 MKL1ΔN200 E2	6.9e-7	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 stably over-expressing constitutively active RAF1
	9.1e-6	up-regulated in neurons.
	5.6e-5	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	2.1e-4	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 stably over-expressing constitutively active MAP2K1
	3.3e-4	down-regulated in MCF-7 cells (breast cancer) positive for ESR1 and long-term adapted for estrogen-independent growth
	4.7e-4	down-regulated in DAOY cells (medulloblastoma) upon knockdown of ALK
	1.9e-3	down-regulated in C57MG cells (mammary epithelium) by over-expression of WNT1
	2.9e-3	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	3.8e-3	down-regulated in MEF cells (embryonic fibroblasts) with knockout of SNF5
	5.7e-3	up-regulated in four lineages of epithelial cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	7.7e-3	down-regulated in HEK293 cells (kidney fibroblasts) upon knockdown of ATM
	8.8e-3	up-regulated in epithelial prostate cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS
	8.9e-3	up-regulated in myometrial cells over-expressing a shortened splice form of ATF2
	9.6e-3	up-regulated in primary epithelial breast cancer cell culture over-expressing activated CTNNB1
	1.2e-2	up-regulated in epithelial kidney cancer cell lines over-expressing an oncogenic form of KRAS

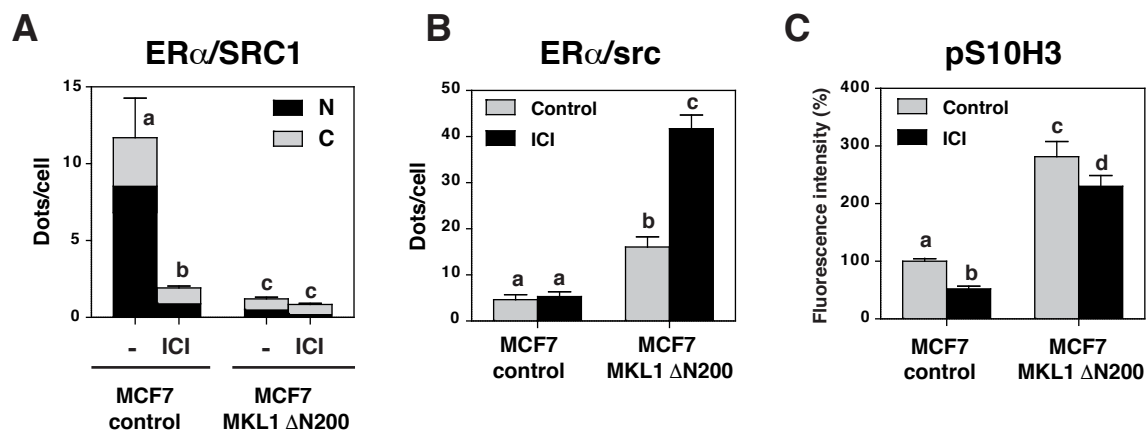
**Figure S4. Annotations of ER $\alpha$  cistromes**

**A**, Distribution of ERBSs at specific features of the genome, as determined using the CEAS tool from the cistrome web-platform (<http://cistrome.org/ap/>). **B**, Functional annotation of genes associated with the corresponding ER $\alpha$  cistrome, as determined using the GREAT tool (<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/index.php>). Only the top 15 MSigDB Oncogenic Signatures are shown here. For full GREAT analysis, refer to Supplementary File3.



**Figure S5. In situ detection of endogenous ER $\alpha$  dimer complex in MCF7 cells by PLA assays.**

**A**, ER $\alpha$  dimers were detected by PLA in MCF7 cells treated or not with 10 nM E2 during 60 min. PLA was performed using an ER $\alpha$  monoclonal antibody (sp1) directly conjugated to the PLA MINUS and PLUS oligonucleotides, as described in the Materials and Methods section of the main manuscript. The detected dimers are represented by red dots. In parallel, ER $\alpha$  staining was visualized by immunofluorescence on the same coverslip. **B**, The graph shows the number of detected nuclear dimer/dots, expressed as a function of the intensity of the ER $\alpha$  nuclear staining by cell. Quantifications of the number of dots/cell and the ER $\alpha$  nuclear staining were performed using ImageJ software on 350 cells. Cells were classified according to the relative intensity of ER $\alpha$  staining and grouped in intensity window every 100 units. The number of dots per cell was then averaged for a given intensity window. Values represent the mean  $\pm$  SEM.



**Figure S6. Effects of ICI 182,780 on the interaction of ER $\alpha$  with SRC1 and src and on the levels of H3S10 phosphorylation in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells**

**A** and **B**, ER $\alpha$ /SRC1 and ER $\alpha$ /src interactions were detected by PLA in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 100 nM ICI 182,780 (ICI) during 24 hours. Quantification of the number of dots/cell was performed using ImageJ software. The respective proportion of complex/dots in the nucleus and in the cytoplasm is shown for ER $\alpha$ /SRC1 interactions. Values represent the mean  $\pm$  SEM. Columns with different superscripts differ significantly ( $n = 10$  to  $15$ ;  $P < 0.05$ ). **C**, densitometry quantification of the fluorescence signal measured on pictures of immunofluorescent detection experiments of phosphorylated histone H3 at serine 10 (H3S10p) in control and MKL1  $\Delta$ N200 MCF7 cells treated or not with 100 nM ICI during 24 hours. Values are expressed as percentage of the intensity measured in control MCF7 cells. Error bars represent SEM ( $n = 20$ ;  $P < 0.05$ ).

**Supplementary Table S1. Oligonucleotides used.**

Assay	name	Sequence	
		Forward primer	Reverse primer
	CXCL12 intron	AGGTGACAAGCCAAGTGTC	GCCTGGTGGCATACTAAAGG
ChIP_qPCR	GREB1 p	CACTTTGAGCAAAAGCCACA	GACCCAGTTGCCACACTTTT
	GPR68A e	GGCACCATGCATACTGCTAA	GGGCACAGTGACACAGAAAA
	IFITM10A e	GGACACTGGGCCTGCTC	TTCATCGCTAGCACGTTG
	Common ERBS #1	TCCTTCAAGGCATTTCTGCT	TGAGACTGAGGAGCCTGCTT
	Common ERBS #2	ACACAGGGCCAGACCTACAC	CCTGGCTGTCGTCTGTATT
	Common ERBS #3	TGGTTGCAGATCTTGTTGGA	TTCTCACACACATCCCCTCA
	Common ERBS #4	CCAGCCTGGTAGAGACGAGT	CCAGCCTGGTAGAGACGAGT
	Lost ERBS #1	AGGGTGACCTTGACCAACAC	ATGGAACTCCCCGGATTAAG
	Lost ERBS #2	CAACCTGACCTTCACCCAGT	GGCAGGCTATCATTTGCATT
	Lost ERBS #3	GTTGAACGCTGAGGCAGTTT	CTGATGCAGCTCAAGGTCAC
	Lost ERBS #4	TTCTCAGAACCCACGCTGAT	GGCTGCTCTGGTATCTGGAA
	Gained ERBS #1	ATTCTGCAGTGGCCCTTC	ACTTGACCACATGCCAACAA
	Gained ERBS #2	TGCCAAAATCACAAAACAACA	CTCTGCTGCTGCCAGTACAC
	Gained ERBS #3	GCTCTAGGAGGCCAAAATC	GTAGGGTCATCGTGCCACTT
	Gained ERBS #4	TGCATCAGAATCTTGGGTTACA	AACTAGGGCCAACCTGACCT

**Supplementary Table S2. HTS statistics.**

<b>Sample</b>	<b>Treatment</b>	<b>Raw reads</b>	<b>Aligned reads</b>	<b>Unique positions</b>
MCF7 Control ChIP ER	Ethanol	31,435,861	24,292,942	10,586,389
MCF7 Control ChIP ER	E2	67,038,917	55,080,268	41,760,717
MCF7 MKL1 $\Delta$ N200 ChIP ER	Ethanol	58,367,414	48,056,925	40,279,271
MCF7 MKL1 $\Delta$ N200 ChIP ER	E2	38,681,817	31,382,956	13,308,820
MCF7 Input	Ethanol	42,117,147	34,000,830	30,686,182
MCF7 Input	E2	35,454,533	27,598,774	17,716,887

**Supplementary Table S7. ER cistromes.** The number of ERBSs identified by MACS2 in each condition is given here, as well as the number of ERBSs remaining following a post-filtration step consisting of removing any ERBS included in repeated regions from the genome as determined in the UCSC database or from the MCF7 genome as gathered from the sequencing of input DNA. The numbers in bold correspond to the number of high-confidence ERBSs used in subsequent analyzes.

p-value	MCF7 Control EtOH		MCF7 Control E2		MCF7 MKL1 ΔN200 EtOH		MCF7 MKL1 ΔN200 E2	
	MACS2	Filtered	MACS2	Filtered	MACS2	Filtered	MACS2	Filtered
1e-15	412	269	199	189	37	0	363	217
1e-12	860	591	250	226	83	0	649	372
1e-10	1,914	<b>1,439</b>	332	276	138	1	1,167	692
1e-9	3,088	2,462	395	303	211	4	1,906	1,245
1e-8	4,355	3,508	483	343	299	11	3,605	<b>2,658</b>
1e-7	8,508	7,212	604	369	489	35	4,881	3,507
1e-6	17,611	15,430	825	446	886	167	10,090	7,921
1e-5	25,408	22,090	1,427	700	1,642	454	22,586	19,714
1e-4	59,910	54,261	3,259	1,671	4,283	<b>2,078</b>	30,019	24,885
1e-3	13,0959	121,109	9,969	<b>6,237</b>	14,436	9,883	66,011	57,143
1e-2	180,976	165,012	39,972	29,921	80,363	67,822	270,239	251,779

## Supplementary Table S11. Public dataset used.

### Transcription Factors

Cell line	Target	(Dataset)	Reference
	ESR1	/	Odom et al, 2010
	FoxA1_1	6566	Hurtado A, et al. Nat. Genet. 2011
	FoxA1_2	6567	Hurtado A, et al. Nat. Genet. 2011
	Dnase_1	45031	Maurano MT, et al. Science 2012
	Dnase_2	45032	Maurano MT, et al. Science 2012
	MAX	46324	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	GABPA	46314	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	REST	46313	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	SRF	46312	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	TAF1	46320	Gertz J, et al.. Mol. Cell 2013
	H3K4me3	UCSC dataset	Encode data
	H3K27ac	UCSC dataset	Encode data
	H3K27me3	UCSC dataset	Encode data
	H3K36me3	UCSC dataset	Encode data
	SIN3A	UCSC dataset	Encode data
	RAD21	UCSC dataset	Encode data
<b>MCF-7</b>	PML	UCSC dataset	Encode data
	EP300	UCSC dataset	Encode data
	MAX	UCSC dataset	Encode data
	JUND	UCSC dataset	Encode data
	HDAC2	UCSC dataset	Encode data
	GATA3	UCSC dataset	Encode data
	Gabp	UCSC dataset	Encode data
	Foxm1	UCSC dataset	Encode data
	FosL2	UCSC dataset	Encode data
	Elf1	UCSC dataset	Encode data
	Egr1	UCSC dataset	Encode data
	Cebp	UCSC dataset	Encode data
	ZNF217	UCSC dataset	Encode data
	TCFL2	UCSC dataset	Encode data
	CTCF	UCSC dataset	Encode data
	TEAD4	UCSC dataset	Encode data





# DISCUSSION



## DISCUSSION GENERALE

L'étude en parallèle de la régulation de la signalisation œstrogénique par l'hypoxie et par le co-activateur transcriptionnel MKL1 est le fruit d'une réflexion qui cherche à comprendre comment l'environnement cellulaire influence l'activité du récepteur aux œstrogènes. Elle vise également à expliquer comment cette modulation de l'activité de ER $\alpha$  peut contribuer à l'établissement de résistance endocrine dans le cas des tumeurs mammaires présentant une croissance hormono-dépendante.

### I. Modulation de la réponse aux thérapies hormonales par l'hypoxie

Dans le premier article, par une approche transcriptomique, nous avons mis en évidence que l'hypoxie affecte de manière différentielle l'expression de gènes cibles d'ER $\alpha$ . En effet, si nous nous intéressons aux gènes régulés positivement par l'E2, ceux-ci peuvent être catégorisés en trois groupes distincts selon leur sensibilité au stress hypoxique : i) ceux dont l'expression est inhibée par l'hypoxie, parmi lesquels CXCL12 et PGR, ii) ceux dont l'hypoxie ne perturbe pas ou peu l'expression, tels que NTN1 ou SGK1, iii) et enfin ceux régulés positivement par l'hypoxie. Au sein de ce sous-groupe, on retrouve certains gènes décrits comme favorisant l'agressivité tumorale dans le cancer du sein mais également dans d'autres types de cancers. En effet, parmi ceux-ci se trouve le facteur de transcription FOXC1, un puissant inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse et donc de la dissémination métastatique dans le cas de tumeurs de sein (avec une forte prévalence dans les cancers de type basal-like) et de l'endomètre mais également dans le mélanome et l'hépatocarcinome (Han et al. 2017). On retrouve également la lysine déméthylase (KDM4B), capable notamment d'effacer la marque histone d'hétérochromatine H3K9me3 et de contribuer à la reprogrammation de la chromatine au cours du processus de dédifférenciation (Jehanno et al. 2017). Dans cet article disponible en annexe de ce manuscrit, nous proposons un modèle mathématique qui permet de décrire comment une cellule préserve son état de différenciation en garantissant le maintien à long terme des marques d'hétérochromatine H3K9me3. Dans ce modèle, une exposition prolongée à des enzymes KDM, par exemple induite par l'hypoxie, fragilise le maintien de la différenciation cellulaire en contribuant à l'effacement de cette marque histone H3K9me3 (Cloos et al. 2006). Par ailleurs, l'enzyme KDM4B est

également associée à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération (Yang et al. 2010), mais également dans la dissémination métastatique (Wilson et al. 2017). Dans cet ensemble de gènes, se retrouve également l'amphiréguline, un membre de la famille des facteurs de croissance de l'épiderme (EGF), décrite pour favoriser la mise en place d'une prolifération hormono-indépendante par l'EGFR (Stiehl et al. 2011). Enfin, nous démontrons que le PGF « Placental growth factor » (Carmeliet et al. 2001), un puissant inducteur de l'angiogenèse est également régulé de manière coopérative par l'hypoxie et par ER $\alpha$ . Par ailleurs, le VEGFa, un autre inducteur de l'angiogenèse, a également été décrit pour être co-régulé par HIF1 $\alpha$  et ER $\alpha$  (Yang et al. 2015). Cela signifie que le programme d'angiogenèse au sein d'une tumeur mammaire ER $\alpha$  (+) peut reposer à la fois sur la signalisation hypoxique et la signalisation œstrogénique (Péqueux et al. 2012), et que des systèmes de coopération, voire de compensation entre les deux facteurs, pourraient exister. Ce recouvrement de régulation génique entre ER $\alpha$  et vraisemblablement les facteurs HIF $\alpha$  suggère que l'hypoxie peut moduler, voire inhiber partiellement l'efficacité d'une hormonothérapie (Yang et al. 2015) en maintenant l'expression d'un certain nombre de gènes cibles d'ER $\alpha$ . Il serait donc peut être intéressant de mettre en place une thérapie combinée visant à inhiber simultanément ces deux facteurs. C'est ce que nous souhaitons tester. Nous envisageons de coupler l'utilisation du FM19G11, un inhibiteur pan-HIF $\alpha$  (Moreno-Manzano et al. 2010), à l'utilisation du 4-OHT ou de l'ICI. Cela permettra éventuellement de démontrer l'efficacité d'un co-traitement pour enrayer l'expression du panel de gènes co-régulés, voire même de restaurer la sensibilité à l'hormonothérapie. En effet, des travaux ont permis de démontrer que l'utilisation du FM19G11 permettait de bloquer la stimulation HIF2 $\alpha$ -dépendante de l'expression de l'EGFR. Cela pourrait bloquer la mise en route d'un programme de prolifération indépendant de l'hormone E2 (Alam et al. 2016).

## **II. Hypothèses sur l'origine du blocage de l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ dans le clone MKL1 $\Delta$ N200**

Alors que l'hypoxie affecte la réponse œstrogénique d'une manière différentielle, les effets du mutant MKL1  $\Delta$ N200 sur l'activité génomique d'ER $\alpha$  sont beaucoup plus tranchés. En effet, après une stimulation de 24h à l'E2, seuls deux gènes conservent une régulation. Les explications de ce blocage radical sont diverses. Premièrement, l'équipe a préalablement démontré que l'activation de la voie RhoA, contrôlant l'activité du facteur MKL1, provoque une forte inhibition de la fonction AF1 d'ER $\alpha$  (Huet et al. 2009). Cette étude démontre par ailleurs que le facteur MKL1 peut interagir physiquement

avec ER $\alpha$  et qu'il peut être recruté à proximité de certains gènes cibles d'ER $\alpha$  tels que CXCL12 et TFF1. On peut donc émettre l'hypothèse que le recrutement de MKL1 et à plus forte raison du mutant MKL1  $\Delta$ N200, pourrait inhiber le recrutement de cofacteurs d'ER $\alpha$ , inhibant ainsi toute régulation de ses gènes cibles. Puis, dans le deuxième article de cette thèse, nous montrons par des analyses de CHIP-Seq d'ER $\alpha$  dans le clone MKL1  $\Delta$ N200 que le recrutement d'ER $\alpha$  sur la chromatine est largement inhibé. En effet, en absence de ligand, nous avons pu détecter environ 1500 ERBSs dans les MCF7 contrôles et moins de 500 dans le clone MKL1  $\Delta$ N200. De la même manière, la mobilisation d'ER $\alpha$  sur la chromatine après 50 minutes de stimulation à l'E2 est également impactée, chutant d'environ 6500 sites dans les MCF7 contrôles à 2700 sites dans le clone MKL1. Nous pouvons donc supposer que cette chute massive du nombre d'ERBSs peut impacter la préparation des enhancers à proximité des gènes cibles et donc leur activation. Cela est confirmé par la perte partielle d'enrichissement de la marque histone H3K27Ac (synonyme d'activité transcriptionnelle), ce qui suggère que la dynamique de recrutement des co-activateurs transcriptionnels peut, elle aussi, être altérée. Par ailleurs, nous avons également détecté une perte d'expression au niveau protéique de certaines sous-unités du complexe médiateur dans les cellules MCF7 exprimant le mutant MKL1  $\Delta$ N200, notamment de MED23 et surtout de MED1. Cette dernière effectue le lien physique entre ER $\alpha$  et le reste du complexe médiateur, indispensable à l'initiation de la transcription (Zhang et al. 2011). La diminution de la concentration intracellulaire de MED1, couplée à la forte inhibition d'ER $\alpha$ , pourrait contribuer de manière synergique à la perte de l'activité génomique du récepteur.

Enfin, l'étude du transcriptome après stimulation à l'E2 a démontré que ce n'est pas seulement la capacité d'ER $\alpha$  à activer la transcription qui est perdue, mais également sa capacité à la réprimer. Cette donnée est à mettre en perspective avec des travaux de l'équipe démontrant que l'expression du mutant MKL1  $\Delta$ N200 reprogramme la chromatine d'une manière extrêmement profonde, notamment avec un fort enrichissement des marques histones H3K9me1, H3K9Ac et H3K27me3, ainsi qu'une chute du taux de H3K9me3 (Flouriot et al. 2014). Nous suggérons que la reprogrammation et/ou la déstructuration de la chromatine puissent instaurer un contexte impropre à l'activation et à la répression transcriptionnelle des gènes cibles d'ER $\alpha$ . Il semblerait que cela soit également vrai pour d'autres récepteurs nucléaires, tels que le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). En effet, des expériences préliminaires de qPCR ont montré que le traitement des cellules MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 par la dexaméthasone s'accompagne d'une inhibition de l'activation des gènes cibles du GR.

### III. Modulation de l'axe CXCL12/CXCR4 par l'hypoxie et le mutant MKL1ΔN200 : implication dans le processus de migration

La chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 jouent un rôle majeur dans l'homéostasie de l'épithélium mammaire. La chimiokine CXCL12, également appelée SDF1 pour « Stromal Derived Factor » est un relai majeur de la prolifération hormono-dépendante des cellules épithéliales mammaires. En effet, en présence d'E2, les cellules épithéliales mammaires exprimant ER $\alpha$  sécrètent dans le microenvironnement cellulaire la chimiokine CXCL12, qui induit de manière paracrine la prolifération des cellules mammaires exprimant le récepteur CXCR4 (Hall and Korach 2003; Tsutsumi et al. 2011). Le rôle du récepteur CXCR7 dans le tissu mammaire demeure quant à lui beaucoup plus méconnu et ne constitue pas un relai de prolifération de la chimiokine CXCL12 (Sánchez-Martín et al. 2013). Par sa contribution au renouvellement de l'épithélium mammaire, CXCL12 est donc fortement associé à la prolifération hormono-dépendante des cellules cancéreuses mammaires. Cependant, son action ne se limite pas à un rôle prolifératif et a été associée de manière claire au processus de migration et de dissémination métastatique des cellules mammaires, de même que pour son récepteur CXCR4 (Kryczek et al. 2007). En effet, de nombreuses études ont montré que CXCL12 possède un fort pouvoir chimiotactique et que des cellules exprimant le récepteur CXCR4 à leur surface enclenchent un programme de migration vers le foyer de sécrétion de CXCL12 (Luker et al. 2012). Lorsque l'expression de CXCL12 dans le microenvironnement tumoral se raréfie, les cellules cancéreuses exprimant ER $\alpha$  ont tendance à enclencher des programmes de migration. C'est d'ailleurs pour cela que les cellules cancéreuses mammaires ont une forte propension à former des métastases au sein des os ou des poumons, organes dans lesquels la chimiokine CXCL12 est fortement exprimée (Luker et al. 2006).

L'analyse transcriptomique des cellules MCF7 sujettes à un stress hypoxique ainsi que des cellules MCF7 exprimant le mutant MKL1  $\Delta$ N200 a révélé, dans les deux cas, une inhibition de l'expression de CXCL12 couplée à une surexpression de son récepteur CXCR4. On constate donc que la balance penche fortement vers l'enclenchement d'un programme de migration. Des expériences de migration permettraient de valider l'augmentation de leur potentiel migratoire en présence d'un gradient de CXCL12. De plus, des études antérieures montrent que l'expression de CXCR4 en hypoxie est dépendante de HIF1 $\alpha$  dans d'autres types de cancers tels que les glioblastomes et les carcinomes de la cavité buccale (Zagzag et al. 2006; Ishikawa et al. 2009). Par ailleurs, nous avons observé que les cellules hypoxiques sécrètent dans le milieu extracellulaire le facteur ANGPTL4 « Angiopoétine-like 4 »,

qui a été décrit comme capable de faciliter et même de promouvoir le phénomène d'extravasation, c'est-à-dire d'infiltration et d'exfiltration des cellules tumorales circulantes dans le sang, à travers la barrière endothéliale (Padua et al. 2008). Nous n'émettons donc l'hypothèse que l'hypoxie ainsi que la voie RhoA/MKL1 peuvent contribuer à la dissémination métastatique des cellules cancéreuses mammaires à partir du foyer primaire en faisant basculer l'axe CXCR4/CXCL12 vers un programme de migration.

#### **IV. Conséquences de l'hypoxie et de l'expression du mutant MKL1 $\Delta$ N200 sur la différenciation luminale des cellules MCF7**

L'étude en parallèle de l'influence de ces deux voies de signalisation, hypoxie d'une part et MKL1 d'autre part, a mis en évidence des similitudes mais également des divergences entre les deux modèles. Tout d'abord, nous montrons que l'hypoxie et le mutant MKL1  $\Delta$ N200 induisent l'inhibition de l'expression d'ER $\alpha$  et de PGR en cellules MCF7, ce qui pourrait contribuer à l'apparition d'une résistance endocrine. Néanmoins, alors que la disparition d'ER $\alpha$  s'opère de façon homogène dans les cellules MCF7 sur-exprimant le mutant MKL1, nous observons une certaine hétérogénéité de la réponse hypoxique. En effet, bien que les analyses par western blot démontrent une forte inhibition de l'expression protéique d'ER $\alpha$  par l'hypoxie, nous montrons par une approche d'immunocytochimie que la disparition d'ER $\alpha$  ne s'opère pas de la même manière d'une cellule à l'autre. En effet, comme cela est illustré par la **figure 30**, nous pouvons détecter une certaine disparité de l'expression d'ER $\alpha$  en réponse au stress hypoxique, avec une population de cellules MCF7 exprimant très faiblement ER $\alpha$  (flèches blanches). Des expériences de co-localisation d'ER $\alpha$  dans ces cellules particulières ont permis de montrer que sa perte d'expression s'accompagne d'une diminution de l'expression du facteur pionnier GATA3 (Eeckhoute et al. 2007), mais pas de FOXA1 (Bernardo et al. 2010). Cela confirme l'existence d'une boucle d'autorégulation spécifique entre ER $\alpha$  et GATA3, et que l'expression de GATA3 caractérise plus spécifiquement le sous type luminal que celle de FOXA1 (Lee et al. 2014). Par ailleurs, on observe que ces cellules exprimant faiblement ER $\alpha$ , n'établissent pas de contacts cellulaires et n'expriment plus de jonctions E-Cadhérine. Enfin et de manière très intéressante, ces cellules présentent une translocation nucléaire de la protéine MKL1. Cela permet de valider un lien décrit dans la littérature entre la relocalisation nucléaire du facteur MKL1 et la privation en oxygène (Cheng et al. 2015; Semenza et al. 2016). Par ailleurs, une relocalisation du facteur FHL2, un partenaire majeur de la kinase FAK « focal adhesion kinase » au niveau des points d'adhésion focaux, permet de confirmer



que ces cellules enclenchent des mécanismes d'adhésion/motilité en augmentant la rigidité de leur matrice extracellulaire (Ilić et al. 1995; Muller et al. 2002; Johannessen et al. 2006). Par contre, et de façon inattendue, nous avons constaté que la translocation nucléaire de MKL1 n'est pas forcément synonyme d'activation de la transcription de ses gènes cibles. En effet, nous n'observons pas l'expression de gènes tels que la cytokératine 14 ou bien de l'actine de muscle lisse ( $\alpha$ SMA) au sein des cellules MCF7 présentant une localisation nucléaire de MKL1 induite par l'hypoxie (Nielsen et al. 2004; Prater et al. 2014). Enfin, corroborant cette observation et suggérant que l'hypoxie induit des comportements hétérogènes en cellules MCF7, des expériences de FACS ont révélé qu'après un stress hypoxique prolongé, une petite population de cellules, de l'ordre 5 à 10% perdait l'expression du marqueur de différenciation luminal CD24 (Sleeman et al. 2005) (données non présentées). De cette observation nous pouvons conclure que l'hypoxie possède un pouvoir dédifférenciant qui s'exerce de façon hétérogène sur les cellules MCF7, mais que ce pouvoir n'est pas assez puissant pour induire un switch d'un phénotype luminal vers un phénotype basal, à l'inverse du facteur MKL1.

En effet, nous montrons dans le second article (figure 1) que l'expression du mutant MKL1  $\Delta$ N200 induit le basculement d'un phénotype luminal vers un phénotype de type basal (**Figure 31**). Nous avons confirmé ce basculement par l'extinction de marqueurs typiques de cellules luminales tels que ER $\alpha$ , PGR, ou encore GATA3 (Eeckhoute et al. 2007; Prat et al. 2013) et par l'apparition de marqueurs phénotypiques du type basal. Parmi ces marqueurs se retrouvent des facteurs de transcription impliqués dans le maintien de la différenciation basale tels que FOXC1 (Tkocz et al. 2012) mais également EGR2 et ID4 (non montré, Guo et al. 2012). Enfin, on retrouve la présence de marqueurs cytoplasmiques, tels que l'actine de muscle lisse ( $\alpha$  SMA, Prater et al., 2014), ou encore la cytokératine 14 (Torsten et al., 2004). De manière intéressante, le clone MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 conserve l'expression de quelques marqueurs luminaux tels que FOXA1 et la cytokératine 18 (Abd El-Rehim et al. 2004; Bernardo et al. 2010), indiquant que le basculement puisse n'est pas total. Enfin, en plus de posséder des attributs de cellules basales/myoépithéliales, le clone MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 exprime des marqueurs représentatifs d'un état fortement mésenchymal, tels que la fibronectine et la N-Cadhérine (Ishimine et al. 2013; Park and Schwarzbauer 2014) (**Figure 31**). Ce n'est donc pas tant l'expression du facteur MKL1 en elle-même qui importe, mais le contexte cellulaire en résultant. D'ailleurs, il est fort probable que le contexte cellulaire d'une lignée stable exprimant un dominant positif du facteur RhoA soit le même que celui induit par l'expression du mutant MKL1  $\Delta$ N200. En effet, l'expression transitoire d'un mutant d'actine (V159N) induisant une polymérisation constitutive en actine filamenteuse (G  $\rightarrow$  F) résume une partie des effets du mutant MKL1  $\Delta$ N200 notamment en induisant la dégradation d'ER $\alpha$

(Kerdivel et al. 2014). Nous pouvons donc affirmer que ce clone de cellules MCF7 exprimant stablement la protéine MKL1 tronquée de son extrémité N-terminale peut être un modèle très intéressant pour l'étude du fonctionnement d'ER $\alpha$  dans un contexte mésenchymal, et donc un environnement cellulaire potentiellement représentatif d'une cellule mammaire métastatique ER $\alpha$  (+).

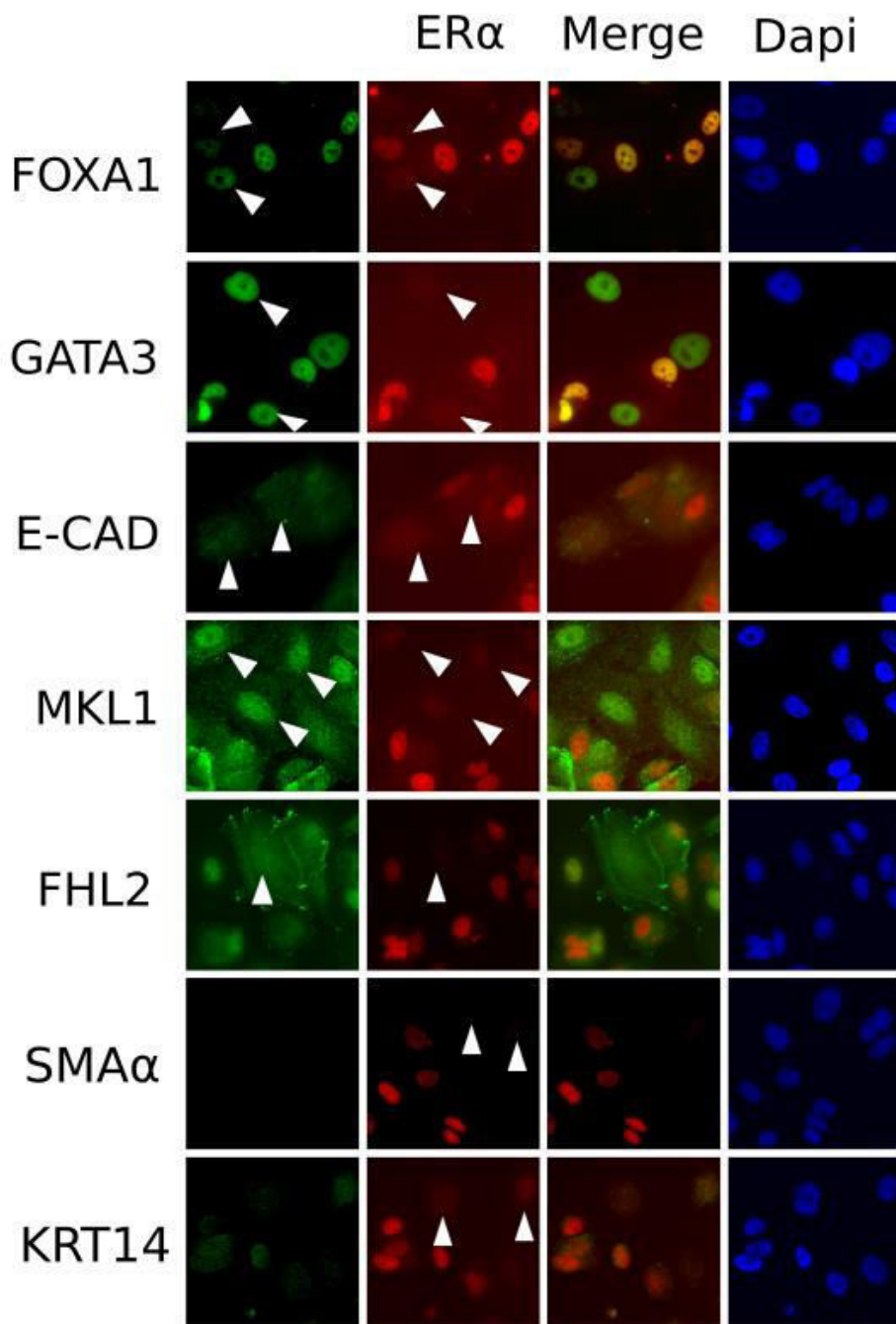


Figure 30 : L'hypoxie provoque une hétérogénéité de la disparition du récepteur aux œstrogènes dans les cellules MCF7.

Expériences de co-marquage d'ER $\alpha$  (rouge) avec divers marqueurs (vert) dans des cellules MCF7 traitées de manière prolongée au CoCl<sub>2</sub>. Les expériences d'immuno-marquage ont été réalisées selon le protocole décrit dans l'article MKL1. Références: Cytokeratin 14 (LL02, sc-58724), ER $\alpha$  (HC-20, sc-543 / 6F11, ThermoFischer), GATA3 (sc-22206), E-cadherin (ab15148),  $\alpha$ SMA (ab5694), MKL1 (ab14984) et FOXA1 (ab23738).

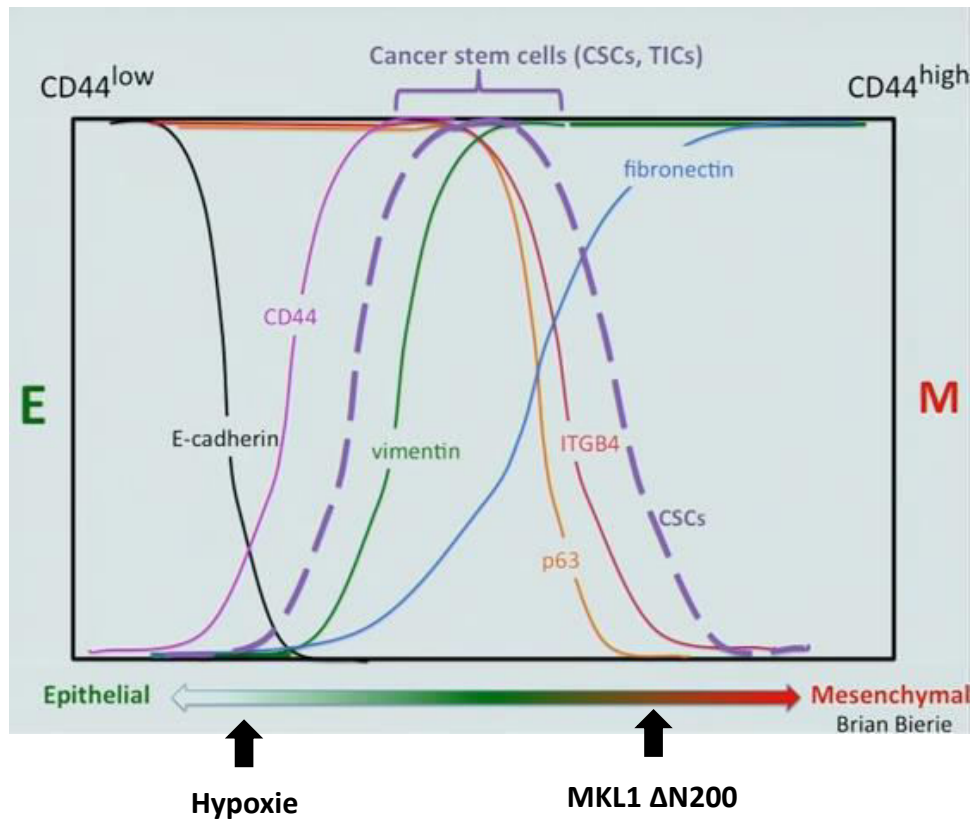


Figure 31: Représentation schématique du spectre de la différenciation des cellules cancéreuses mammaires proposée par RA Weinberg.

Les cellules épithéliales qui expriment fortement l'E-cadhérine et qui sont CD44 (---) peuvent proliférer mais ne possèdent qu'un très faible pouvoir métastatique car elles n'ont aucun des attributs qui leur permettraient de se disséminer. A l'inverse, les cellules qui expriment la fibronectine et qui sont CD44 (+++) dans un état totalement mésenchymal possèdent de fortes capacités de migration, mais n'ont plus la possibilité de réenclencher un programme de prolifération. Robert Weinberg émet l'hypothèse que les cellules qui résident dans un état de différenciation situé au milieu de ce spectre sont les cellules souches cancéreuses (CSC) capables à la fois d'avoir des propriétés prolifératives mais également de migration. Le retour à l'état souche est très intimement associé à l'activation du programme EMT. La plasticité des CSC leur confère un caractère très fortement malin, car elles retiennent la capacité de pouvoir migrer puis proliférer lorsqu'elles se sont réimplantées dans un microenvironnement qui leur est favorable. Les marqueurs présentés dans ce schéma signent le degré de différenciation / dédifférenciation d'une cellule cancéreuse.

Les flèches indiquent où se situent les cellules MCF7 en hypoxie ou bien exprimant le mutant MKL1 ΔN200 sur le spectre de la dédifférenciation. L'hypoxie ne possède qu'un faible pouvoir dédifférenciant, alors que l'activation de la voie MKL1 quant à elle aboutit à la perte totale des jonctions E-Cadhérine et à l'apparition de marqueurs tels que l'actine de muscle lisse ou la fibronectine, typiques d'un état mésenchymal.

(Figure extraite d'une conférence de RA Weinberg disponible sur Youtube : EMT, Cancer Stem Cells and the Mechanisms of Malignant Progression).

En effet, des travaux publiés par Jason Carroll en 2012 démontrent qu'il existe une certaine plasticité du cistrome d'ER $\alpha$  en fonction du stade tumoral. Certains ERBSs du cistrome d'ER $\alpha$  peuvent être redistribués en fonction du pronostic clinique des tumeurs ER $\alpha$  (+) mais aussi au sein des métastases exprimant ER $\alpha$  (Ross-Innes et al. 2012). Les auteurs ont notamment pu extraire une signature cistromique d'ER $\alpha$  de mauvais pronostic thérapeutique, associée spécifiquement aux métastase ER $\alpha$  (+) et aux lignées résistantes à l'hormonothérapie présentant une amplification du récepteur HER2. Cette signature est composée d'ERBSs enrichis en sites FOXA1 mais déplétés en sites GATA3. De manière très intéressante, nous retrouvons une signature extrêmement similaire en considérant les ERBSs retrouvés spécifiquement au sein des cellules MCF7 MKL1  $\Delta$ N200. L'annotation fonctionnelle (GREAT) de ces ERBSs acquis *de novo* montre qu'ils se localisent à proximité de gènes impliqués dans la transduction du signal EGF/Ras. Ces observations valident l'existence d'un certain degré de plasticité dans la distribution du cistrome d'ER $\alpha$  mais que cette plasticité n'est pas aléatoire, elle est plutôt finement orientée par le contexte cellulaire associé. De façon intéressante, nous montrons qu'il n'existe aucun recouvrement entre les ERBSs spécifiquement identifiés dans le clone MKL1  $\Delta$ N200 et dans les cellules MCF7 en hypoxie (**figure 32**). Cela conforte l'idée selon laquelle l'impact de l'hypoxie et du mutant MKL1  $\Delta$ N200 sur l'état de différenciation cellulaire des MCF7 est sensiblement différent.

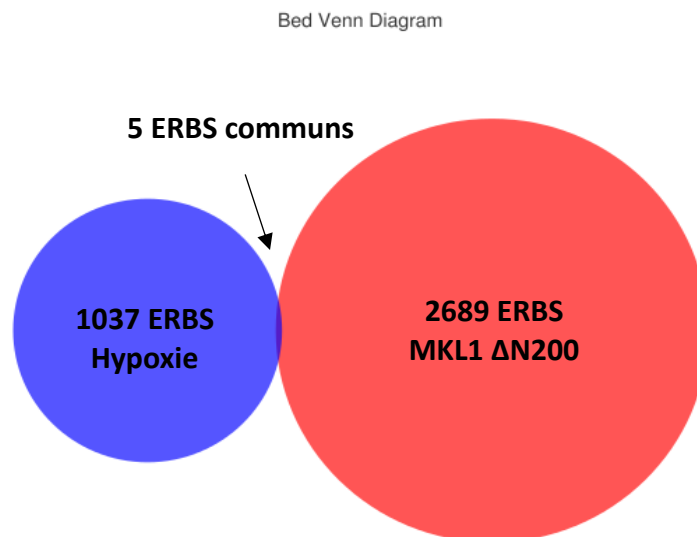


Figure 32: Diagramme de Venn montrant l'absence de recouvrement entre les ERBS détectés *de novo* en hypoxie et dans le clone MKL1  $\Delta$ N200.

L'annotation fonctionnelle a été réalisée à l'aide de la plateforme d'analyses en ligne GALAXY entre les fichiers .bed correspondant aux sites retrouvés dans le clone MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 (bleu) et aux sites hypoxie-spécifiques (rouge).

## V. Le basculement d'ER $\alpha$ d'une activité génomique vers non génomique est-il une caractéristique des cellules agressives ?

Dans le point précédent, nous avons essayé de convaincre le lecteur de l'utilité des cellules MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 comme modèle intéressant d'étude d'ER $\alpha$  dans un contexte de cellules métastatiques. En effet, nous avons observé que dans ce modèle (et non en hypoxie), le récepteur bascule d'une activité génomique vers une activité non-génomique. Par de multiples approches nous montrons qu'ER $\alpha$  possède une conformation monomérique majoritaire et qu'il présente une forte interaction avec des partenaires cytoplasmiques, et ce en absence ou en présence de ligand E2.

Premièrement, nous montrons (cf article 2) qu'au sein des cellules MCF7 exprimant le mutant MKL1  $\Delta$ N200 s'opère une relocalisation d'ER $\alpha$  au niveau du cytoplasme. Ensuite, les expériences de Scatchard tendent à montrer qu'il existe un déplacement de l'équilibre monomère/dimère en faveur du monomère, en absence de ligand. Cette observation est en accord avec l'absence de motifs ERE (liés par un dimère ER $\alpha$ ) dans les ERBSs spécifiquement retrouvés dans le clone MKL1  $\Delta$ N200, en absence de ligand. Par ailleurs, nous avons adapté la technique de PLA « Proximity Ligation Assay » permettant de quantifier l'interaction entre deux protéines, à l'étude de la dimérisation d'ER $\alpha$  en utilisant deux anticorps anti-ER $\alpha$  d'origine différente. Cette approche nous a permis de montrer que la quantité de récepteur sous forme dimérique au sein des cellules MCF7 MKL1  $\Delta$ N200 est deux à trois fois inférieure aux cellules contrôles. Enfin, plusieurs études montrent qu'ER $\alpha$  interagit avec les complexes HSP70 et HSP90 sous sa forme monomérique (Pratt and Toft 1997; Dhamad et al. 2016). Nous montrons également par l'approche PLA qu'il existe une augmentation des interactions d'ER $\alpha$  avec la protéine chaperonne HSP70 au sein de ces cellules MCF7 MKL1  $\Delta$ N200, ce qui confirme la prédominance de sa forme monomérique.

Ces résultats coïncident avec une forte augmentation des interactions d'ER $\alpha$  avec divers partenaires cytoplasmiques tels que SRC, PI3K et MSK1 (Poulard et al. 2012 ; Reyes et al. 2014) et ce, même en absence de ligand E2. Par ailleurs, une hyperactivité des voies MAPK et PI3K avait préalablement été constatée par l'équipe (Kerdivel et al. 2014) ainsi qu'une forte surexpression de la cavéoline 1 par le mutant MKL1 (donnée non présentée), ce qui pourrait permettre d'expliquer la forte augmentation de ces interactions « non génomiques » de façon ligand indépendante. De façon très surprenante, l'ICI n'est pas capable de bloquer ces interactions alors qu'il antagonise toutes interactions du récepteur avec les co-activateurs nucléaires tels que SRC1. Nous n'avons pour le moment pas associé de rôle fonctionnel à ces interactions. Néanmoins, ces observations sont à mettre

en perspective avec des travaux de la littérature qui décrivent une forte prévalence de l'activité non génomique du récepteur au sein des métastase ER $\alpha$  (+) (Saha Roy and Vadlamudi 2012). En effet, de multiples études montrent un rôle « non génomique » d'ER $\alpha$  dans l'acquisition de fonction de motilité cellulaire après une stimulation rapide à l'E2 (Rajhans et al. 2007). La formation d'un complexe de signalisation ER $\alpha$ -SRC-PELP1-PI3K-ILK1 a été montrée comme nécessaire à la réorganisation du cytosquelette. Les auteurs affirment que l'activation de manière non-génomique par ER $\alpha$  de multiples kinases décrites pour favoriser la migration cellulaire, telles que ILK1 ou bien src (Persad and Dedhar 2003; Finn 2008), pourrait participer au développement de métastases dans les tumeurs ER $\alpha$  (+) (Li et al. 2010). De plus, un rôle d'ER $\alpha$  dans l'établissement de métastases osseuses a été récemment décrit (Chiu et al. 2017). Les auteurs ont généré une lignée de cellules MCF7 transformée par le facteur SNAIL capable de générer des métastases. Ils ont montré que l'inhibition d'ER $\alpha$  et de la kinase src s'accompagne d'une chute de la capacité de ces cellules MCF7 à métastaser au niveau des os. Par ailleurs, une étude conduite par l'équipe de Muriel le Romancer a permis de montrer, par la technique de PLA, que les associations ER $\alpha$ /src et ER $\alpha$ /PI3K sont corrélées de manière significative *in vivo* à une augmentation du taux de rechutes chez les patientes atteintes d'une tumeur mammaire ER $\alpha$  (+) (Poulard et al. 2012). Enfin, il a été montré que dans des cellules HCC38 n'exprimant pas l'isoforme de 66 kDa mais exprimant l'isoforme de 36 kDa d'ER $\alpha$ , l'E2 pouvait induire une activation rapide de la kinase PKC, ce qui aboutit via ER $\alpha$  36 à l'expression de gènes tels que SNAIL, RANKL ou encore CXCR4, impliqués dans les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire (Chaudhri et al. 2012).

En conclusion, nous pouvons dire que cette hyperactivité « non génomique » d'ER $\alpha$  contraste fortement avec l'absence totale d'activité au niveau génomique dans le clone MKL1  $\Delta$ N200. Il serait intéressant d'étudier par des approches de PLA, l'interaction d'ER $\alpha$  avec divers partenaires cytoplasmiques tels que MSK1, SRC et PI3K sur des coupes histologiques de cellules cancéreuses mammaires métastatiques provenant de différents organes, traitées ou non par hormonothérapie, selon la méthode de Poulard et al. 2014. Cela permettrait de renforcer la pertinence des résultats de Poulard et al. 2012, et de valider nos résultats sur l'absence d'effet de l'ICI sur ces interactions. La suite du travail consistera à attribuer un rôle fonctionnel à ces interactions, et d'explorer leur contribution à la mise en place de résistance endocrine. Enfin, afin de conforter nos travaux, nous allons explorer l'expression du facteur MKL1 en co-marquage avec ER $\alpha$  sur des coupes histologiques provenant à la fois de tumeurs primaires ER $\alpha$  (+) mais également de métastases mammaires exprimant ER $\alpha$ . Cela nous permettra de valider l'expression de MKL1 dans l'épithélium mammaire humain (Li et al. 2006) et d'évaluer si oui ou non MKL1 peut constituer un marqueur pronostique.

# ARTICLES ANNEXES





## ARTICLE N°3

Jehanno C, Flouriot G, Le Goff P, Michel D. 2016

A model of dynamic stability of H3K9me3 heterochromatin to explain the resistance to reprogramming of differentiated cells. *Biochim Biophys Acta. Gene Regulatory Mechanisms*. 1860, 184-195.

Il apparaît clairement dans la littérature scientifique que le maintien de l'état différencié est largement assuré par le maintien d'une chromatine compacte, où seuls les gènes correspondant au type cellulaire normal peuvent être exprimés. De nombreuses données montrent que l'acteur essentiel de ce maintien est l'hétérochromatine H3K9me3. La notion de marque a pourtant été remise en question avec la découverte d'enzymes capables de les effacer et qui sont présentes simultanément avec les enzymes de marquage dans les cellules. Les marques individuelles ne sont pas permanentes mais effacées et renouvelées de façon cyclique, ce qui semble remettre en question leur persistance et leur solidité. Mais en dépit de leur fugacité, certaines marques s'avèrent extraordinairement solides, ce qui est essentiel dans le cas de H3K9me3 pour maintenir tout au long de la vie le phénotype bien différencié de nos cellules post-mitotiques, et ainsi éviter le risque de dédifférenciation et de cancer. Nous avons proposé dans cet article un modèle dynamique de solidité couplant rétroactions positives et négatives. Ce modèle est étayé par des simulations numériques utilisant des paramètres cinétiques réalistes et illustrés par des mesures en immunocytochimie. Ce modèle est l'un des rares actuellement proposés pour expliquer une puissante résistance au changement dans un contexte dynamique.

Néanmoins, aussi résistante que soit cette marque, une surexpression soutenue et continue d'enzymes déméthylases permettant l'effacement de la marque H3K9me3 comme KDM4B, peut quand même fragiliser l'hétérochromatine et ouvrir la voie à la dédifférenciation. Notons que l'enzyme KDM4B est précisément surexprimée dans les situations d'hypoxie, ce qui nous ramène à mon travail principal de thèse décrit dans ce manuscrit.

Cet article a occupé les premiers mois de travail de ma thèse avant que celle-ci ne se focalise sur l'étude d'ER $\alpha$ .



# A model of dynamic stability of H3K9me3 heterochromatin to explain the resistance to reprogramming of differentiated cells

Charly Jehanno<sup>a</sup>, Gilles Flouriot<sup>a</sup>, Pascale Le Goff<sup>a</sup> and Denis Michel<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup>Universite de Rennes1-IRSET. Campus santé de Villejean 35000 Rennes, France.

Despite their dynamic nature, certain chromatin marks must be maintained over the long term. This is particularly true for histone 3 lysine 9 (H3K9) trimethylation, that is involved in the maintenance of healthy differentiated cellular states by preventing inappropriate gene expression, and has been recently identified as the most efficient barrier to cellular reprogramming in nuclear transfer experiments. We propose that the capacity of the enzymes SUV39H1/2 to rebind to a minor fraction of their products, either directly or via HP1 $\alpha/\beta$ , contributes to the solidity of this mark through (i) a positive feedback involved in its establishment by the mutual enforcement of H3K9me3 and SUV39H1/2 and then (ii) a negative feedback sufficient to strongly stabilize H3K9me3 heterochromatin in post-mitotic cells by generating local enzyme concentrations capable of counteracting transient bursts of demethylation. This model does not require direct molecular interactions with adjacent nucleosomes and is favoured by a series of additional mechanisms including (i) the protection of chromatin-bound SUV39H1/2 from the turnovers of soluble proteins, which can explain the uncoupling between the cellular contents in SUV39H1 mRNA and protein; (ii) the cooperative dependence on the local density of the H3K9me3 of HP1 $\alpha/\beta$ -dependent heterochromatin condensation and, dispensably (iii) restricted enzyme exchanges with chromocenters confining the reactive bursts of SUV39H1/2 in heterochromatin. This mechanism illustrates how seemingly static epigenetic states can be firmly maintained by dynamic and reversible modifications.

## 1 Introduction

### 1.1 H3K9me3 and differentiation

The resistance and inheritance of repressive chromatin modifications are supposed to result from complex networks of interactions between specific DNA regions and chromatin-modifying enzymes, mediated by a plethora of molecular actors including non coding RNA, co-repressors and methyl-cytosine binding proteins link-

ing DNA methylation to histone modifications. However, a simpler picture recently emerged when showing that modifications forced at arbitrary DNA regions can be propagated as well by histone modifying enzymes over cellular generations [1]. The number of actors necessary to stabilize epigenetic states will also be limited in the simplified and original model presented here for the mark H3K9me3, that is crucial for preserving cellular integrity [2] and forbidding dedifferentiation. Indeed, this mark has recently been shown remarkably resistant and identified as the primary barrier preventing reprogramming in nucleus transfer experiments [3, 4]. The transplanted nuclei carry in a purely epigenetic manner the factors ensuring the stable maintenance of the cellular differentiation status. H3K9me3 appears as the security bolt for silencing the genes incompatible with this differentiation, a role previously foreseen for DNA methylation supposedly less dynamic. In fact, a loss of H3K9me3 but not of DNA methylation, was observed in the model of chromatin loosening of WRN-deficient cells [5] and earlier studies showed that DNA methylation follows H3K9 trimethylation [6, 7].

H3K9me3 strongly increases during normal cell differentiation [8] and conversely, low H3K9me3 and diffuse euchromatin characterize stem cells [9, 10], consistent with their background of generalized gene expression [11] and their self-renewal [12]. SUV39H1 and SUV39H2 are the major enzymes responsible for H3K9 trimethylation, because their inactivation in embryonic cells is not compensated by other enzymes with the same activity such as SETDB1 [13].

The reverse process of chromatin loosening has been reported in cancer cells which acquire globally open chromatin with prominent histone acetylation and lower H3K9me3 [9, 14, 1]. The loss of heterochromatin in cancer is also reflected by the decondensation of Barr bodies (X inactivated) in many breast and ovarian cancers [16]. The weakening of constitutive heterochromatin causes genome instability [17] while that of facultative heterochromatin leads to deregulated gene expression, with possible reactivation of tumor promoting genes. A drop of H3K9me3/SUV39H1 heterochromatin is also

\*denis.michel@live.fr

clearly associated with aging [5]. The H3K9 trimethylase SUV39H1 has been shown anti-tumorigenic [18, 2, 19] whereas conversely, JMJD2 enzymes which have the opposite activity, have been shown oncogenic [20, 17]. Various H3K9me3 demethylases are induced during hypoxia [21]. Upregulation of JMJD2A/KDM4A by gene amplification or hypoxia, leads to gene copy gains through re-replication [22]. Certain reports on H3K9me3 in cancer are however conflicting since an increase of H3K9me3 and SUV39H1 activity has also been observed in malignant cells. This seeming paradox could in fact have been expected if considering the contractile phenotype of metastatic cells as a secondary differentiation state different from that of the cell at the origin of the cancer, for instance epithelial [23].

## 1.2 Heterochromatin organization

Two main types of silencing heterochromatin (associated to either H3K9me3 or H3K27me3 marks) are differently used by vertebrate species [24] and may be involved in different circumstances in a given species. H3K9me3 has been proposed to precede long term polycomb-mediated chromatin closure [25] but inversely, H3K27me3 has also been suggested to be a temporary repression signal controlling developmental genes [26]. These two marks can coexist and concern different subsets of chromosomal regions. H3K27me3 is mainly found in regions including unmethylated CpG-rich sequences, whereas H3K9me3 regions generally contain methylated DNA. H3K9me3 heterochromatin appears malleable [27], and has stabilizing and repressive roles for constitutive heterochromatin (repetitive DNA and centromeres) and facultative heterochromatin (developmentally turned off genes). H3K9me3 heterochromatin is specifically bound to heterochromatin protein  $1\alpha/\beta$  (thereafter collectively written HP1), a protein involved in its condensation into densely packed structures known as chromocenters, historically characterized in cytology by their capacity to trap more dye (such as Feulgen or methylene blue), and now often called pericentromeric heterochromatin (PCH). The nuclear organization of the chromocenters is strangely variable. It is perinuclear and perinucleolar in MCF7 human cells but take the form of well-delimited spheres scattered throughout the nucleus in murine cells [28]. As this organization greatly facilitates experimental studies, murine cells like 3T3 mouse cells are generally selected, what will be done here also. Interestingly in nocturnal mammals, heterochromatin otherwise located at the nuclear periphery, accumulates at the center of the nucleus of photoreceptor cells, probably for convenience to facilitate light sensing [29]. These disparate locations tend to minimize the importance of nuclear architecture to regulate heterochromatin. Although chromocenters are mainly associated to constitutive heterochromatin, they can also include facultative heterochromatin. Genes irreversibly silenced during de-

velopment [30], LINE retroposons [31] and E2F-target genes in post-mitotic differentiating cells [32] can also relocate into these structures. Interestingly, the presence of SUV39H1 bound to H3K9me3 has been evidenced by chromatin immunoprecipitation in LINE, before their progressively decrease and replacement by DNA methylation [31]. The formation of H3K9me3 heterochromatin depends on the density of H3K9me3 [33] but not on DNA sequences, as clearly illustrated by the lack of sequence conservation of centromeric DNA between species [28].

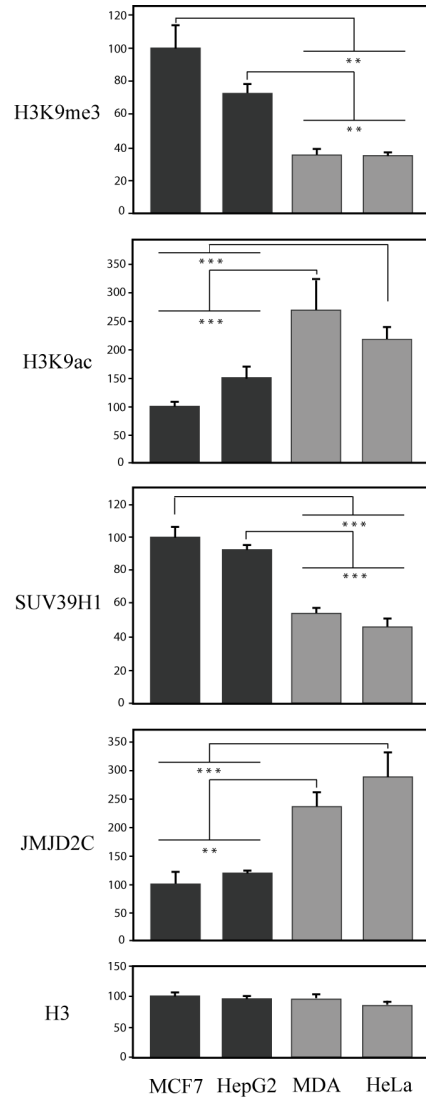
## 1.3 Dynamic stability

Cells and their epigenetic marks are open systems with permanent molecular renewal, in which no molecular complexes can be definitely locked [34, 35]. Chromatin modifications were initially considered as static epigenetic marks, but have then been shown highly reversible and labile, continuously written and erased by antagonistic chromatin-modifying and -demodifying enzymes present together in the cell [36]. Nevertheless, adult somatic cells must securely maintain their differentiation status in long-lived species. This apparent problem is solved by mechanisms called dynamic stability. For example, in differentiated cells, H3K9me3/HP1 $\alpha/\beta$  heterochromatin is stable for years in spite of the very fast exchange of HP1, initiating the concept of dynamic stability [37]. The rapid turnovers of chromatin modifications imposed us to look for new, dynamic mechanisms ensuring the steady-state stability of chromatin configurations. Following the pioneer model of [38], positive feedbacks mediated by various interactions between histone-interacting and sometimes DNA-interacting machineries, have been proposed to ensure the copying of chromatin modifications during DNA replication and the regional spreading of chromatin states [39, 40, 41]. The role of certain chromatin-modifying enzymes, including SUV39H1, in this mechanism has been attributed to their capacity to rebind to their enzymatic product and to the existence of a rate of cis-propagation of enzymatic reactions from modified sites to adjacent unmodified sites in the vicinity [42, 43, 27, 44]. Mechanisms called nucleation and looping have recently been developed [5, 46], involving in the case of SUV39H, complex interaction networks including HP1 and methyl-DNA binding proteins [5]. In this latter model, an immobile fraction of SUV39H catalyses the formation of H3K9me3 in the surrounding region, whose extent is restricted by the possibility of DNA looping. But even in absence of replication copying and following their initial establishment, chromatin modifications should be maintained for years in post-mitotic differentiated cells, that is to say during time windows much larger than the turnovers of all chromatin-modification and molecular immobility. New mechanisms are proposed here, which are based on the dynamic rebinding of SUV39H enzymes to its products and can contribute to the solidity of H3K9me3 hete-

rochromatin and by this way prevent cancer and increase longevity. The phenomenon of rebinding of chromatin-modifying enzymes, that is not specific to SUV39H, is generally assumed to underly the propagation and mitotic memory of chromatin marks through information transfers between modified and unmodified nucleosomes. In the present model, the rebinding of SUV39H1/2 to their products participates to the robustness of established heterochromatin. This mechanism is original in that (i) it does not rely on ternary complexes and direct physical transfers between modified and unmodified nucleosomes, (ii) it is functional at a regional scale, for example in chromocenters, and not restricted to adjacent nucleosomes and (iii) it is capable of ensuring the resistance of chromatin marks once established, by preparing, in a latent form, a massive source of free SUV39H capable of counteracting a stimulus responsible for its release.

## 2 Experimental observations

The model proposed below is built on reports from the literature and a few additional observations. The ideal material for studying the maintenance of H3K9me3 in adult cells would be post-mitotic tissular cells, but as they can not be easily cultured and manipulated, cell lines are generally used instead. These cell lines are however interesting in that they differ in their index of epithelial dedifferentiation, as reflected for instance by the degree of disruption of E-cadherin adhesion complexes [1]. Fig.1 shows the comparison of four widely used cell lines, two retaining a relatively high differentiation status: the mammalian MCF7 mammary epithelial cells and the human HepG2 hepatocytic cell line; and two with a more de-differentiated status: the human MDA-MB-231 and HeLa cells. Compared to these two latter ones, the first two ones are characterized by higher levels of H3K9me3 and H3K9 trimethylase SUV39H1, and lower levels of H3K9ac and H3K9me3 demethylase JMJD2C/KDM4C. These measurements further support the association between global H3K9me3 and differentiation.

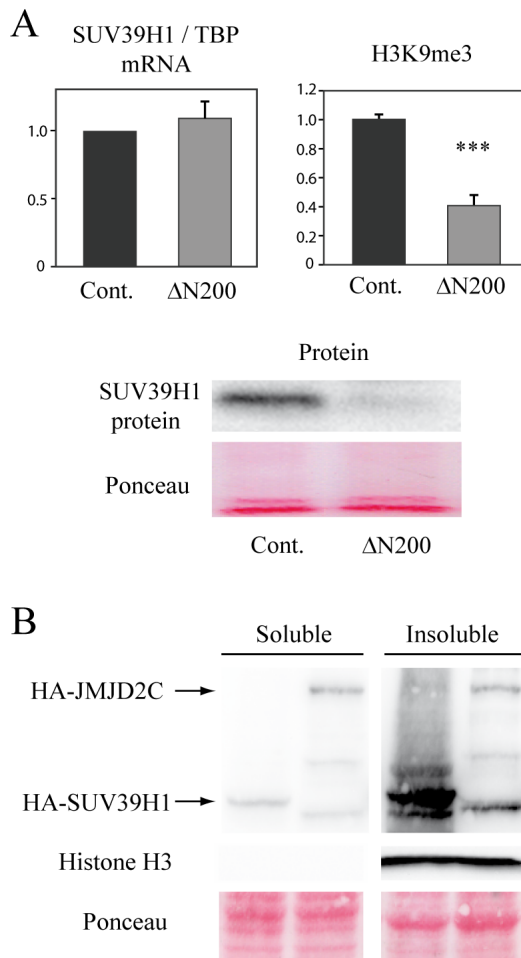


**Figure 1** Comparison of H3K9 trimethylation and acetylation and SUV39H1 and JMJD2C proteins in human cell lines known for their low (MCF7 and HepG2) or high (MDA-MB-231 and HeLa) dedifferentiation grade. The fluorescence intensity was quantified and normalized by the mean intensity obtained in MCF7 cells arbitrarily set to 100. Anova one-way test was used. Asterisks indicate significant differences between each cell line for a given quantification (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).

### 2.1 Regulation of SUV39H1 with the degree of heterochromatinization

To minimize the number of parameters, instead of comparing different cells, it is preferable to study heterochromatin in the same cell type. We developed a cellular tool to decrease heterochromatin in the human MCF7 cells, using the stable expression of a mutant version of MKL1 involved in mechano-signalling, deleted from its N-terminal region ( $\Delta N200$ ) [1]. Heterochromatin loos-

ening triggered by stable expression of this deletion mutant of MKL1 using a tetracyclin-inducible expression system, significantly decreases H3K9me3. The mechanism of heterochromatin disruption caused by MKL1- $\Delta$ N200 is currently unknown, but good candidates for mediating this effect are the JMJD2 demethylases which are upregulated. Interestingly, an important decrease of the SUV39H1 protein, but not of the SUV39H1 mRNA, was observed, by western blot (Fig.2A) and by cytoimmunofluorescence (60% decrease), compared to control MCF7 cells stably transfected with the empty vector.



**Figure 2** SUV39H1 mRNA and protein in the cell. (A) Down regulation of the SUV39H1 protein in H3K9me3-poor in MCF7  $\Delta$ N200 cell line, but not of the SUV39h1 mRNA. The fluorescence intensity of the H3K9me3 mark was performed as previously described using ImageJ. Mann-Whitney test was used. Asterisks indicate significant differences between each condition, control and  $\Delta$ N200 (\*\*\*)  $P < 0.001$ . (B) Soluble and insoluble fractions of MCF7 cells transiently expressing HA-tagged SUV39H1 or JMJD2C, were probed by immunoblotting using the same antibody directed against the HA epitope. Contrary to JMJD2C, SUV39H1 strongly accumulates in the insoluble fraction containing chromatin (• nonspecific signals).

On the one hand, the presence of high levels of H3K9me3 in cells containing more SUV39H1 is obviously expected since H3K9me3 is the product of the SUV39H1 enzyme. But on the other hand, the origin of the high amount of SUV39H1 in cells containing more H3K9me3 should be explained. As shown in Fig.2, it can not result from a higher SUV39H1 gene expression level because the mRNA content is unchanged. Alternatively, the fact that SUV39H1 binds to H3K9me3 and a series of observations from the literature, suggest the possibility that SUV39H1 protein can be stabilized by fixation on chromatin. This post-transcriptional mechanism would provide an explanation for the apparent disconnection between the regulation of the SUV39H mRNA and protein (Fig.2). Indeed, a decrease of the SUV39H1 protein has been shown during heterochromatin loosening in earlier studies, which reported that the phosphorylation of Serine 391 of SUV39H1 induces simultaneously the dissociation of SUV39H1 from chromatin [48] and its proteasomal destabilization [19]. This dual effect of the modification of the same residue shows that SUV39H1 solubilization and degradation are correlated events, and that the insolubilization of SUV39H1 in heterochromatin could protect it from degradation. Under this hypothesis, SUV39H1 is expected to be less stable in absence of H3K9me3 heterochromatin, for example following a pulse of JMJD2A and massive H3K9me3 demethylation which has been shown to solubilize SUV39H1 [47]. This is a cycle of reciprocal influences between H3K9me3 and SUV39H1, in which SUV39H1 increases the level of H3K9me3 and conversely H3K9me3 stabilizes the fraction of SUV39H1 to which it is bound. Biochemical fractionation experiments using the control cells transfected with either HA-tagged SUV39H1 and HA-tagged JMJD2C, showed that the large majority of HA-SUV39H1 is present in the insoluble fraction which contains all the chromatin fraction as verified using H3 immunoreactivity (Fig.2B).

## 2.2 SUV39H1 is reversibly bound to chromatin

Most SUV39H1 appears bound to chromatin (Fig.2B), but fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analyses showed that it is in fact subject to permanent association-dissociation cycles, with different mean cycling times ranging from seconds to minutes depending on the fractions [49, 5]. In self-renewing cells expressing SUV39H1-GFP, the recovery of fluorescence in bleached areas shows that all the SUV39H1 fractions are interchangeable. This reversibility of the association between SUV39H1 and chromatin is in line with the removal of SUV39H1 caused by demethylation and acetylation of H3K9. For example, the mobility of SUV39H1 is increased by experimental expression of JMJD2/KDM4 enzymes [47, 5].

## 2.3 Chromocenter formation and SUV39H1-HP1 functional relationships

The role of HP1 in the rebinding of SUV39H1 to H3K9me3 is unclear. The enzymatic activity of SUV39H1 has been shown necessary for its accumulation at heterochromatic sites [50, 51]. The accumulation of SUV39H1 on chromatin is clearly a rebinding phenomenon, not related to its catalytic activity, because the enrichment of SUV39H1 in H3K9me3-dense regions is also observed for a catalytic mutant of SUV39H1 (Fig.S1B). This accumulation was considered indirect and mediated by HP1 [52, 53]. But SUV39H1 has also been shown self-sufficient for H3K9me3 binding in vitro [54] and in vivo [49, 55, 44], which is expected in principle since SUV39H1/2, like HP1, have a chromodomain. The partial disruption of heterochromatin by hyperacetylation using Trichostatin A (TSA) treatment, leads to the complete dislocation of HP1 from the residual chromocenters, whereas SUV39H1 still binds them [5]. This latter result suggests that HP1 is, at least partially, dispensable for SUV39H1 binding to established heterochromatin. The proper enzymatic activity and subcellular localization of SUV39H1 are not altered by fusion with a fluorescent protein irrespective of whether it is linked to its C-terminus or its N-terminus, corresponding to its domain of interaction with HP1, suggesting that it is not critical for chromatin binding (data not shown). The accumulation of HP1 and SUV39H1 in heterochromatin could proceed through different mechanisms [49, 44], which do not forbid interactions between these molecules. In this study, we will not assume a particular hypothesis on the involvement of HP1 on SUV39H1 binding. SUV39H1 will be supposed to rebind to H3K9me3 either directly or indirectly through HP1. HP1 will be nevertheless essential for its established role in the condensation of H3K9me3 heterochromatin. The binding of HP1 to H3K9me3 and its condensation-promoting role are cooperative. Through its capacity to cross-link nucleosomes, HP1 triggers the condensation of H3K9me3-rich regions [56, 57, 58, 59]. Such a mechanism has not been reported for SUV39H1/2. HP1 will be assumed to condense DNA in a nonlinear manner over a critical density of H3K9me3 marks. The density of H3K9me3 has been suggested to be only slightly higher inside than outside the chromocenters [5]. If chromocenters are defined by the intensity of DAPI staining, the intensity of the H3K9me3 signal appears much higher in these areas compared to the rest of the nucleoplasm (top panels of Fig.S1A), but this sharp difference can result from two causes difficult to distinguish: the proportion of H3K9me3 and the degree of compaction. However, the near complete exclusion of H3K9ac labelling from these condensed regions (Fig.S1A) suggests that the different marks are significantly segregated in and out of the chro-

mocenters.

## 3 General principles applying to chromocenters

### 3.1 Ligand rebinding to receptor arrays

The large arrays of H3K9me3 moieties of the chromocenters to which diffusing SUV39H1 can bind, is a typical case of clustered receptors. The capacity of clustered receptors to bias ligand rebinding has been abundantly investigated, mainly for cell surface receptors [60, 61, 62, 63, 64, 65], but without clear consensus. Both association and dissociation rates have been suggested to be affected by high receptor density. These studies introduced several notions, like (i) the "encounter complexes" [61, 66], which are virtual complexes in which the ligand is neither free nor bound but close enough to bind, or (ii) a parameter named likelihood of prompt rebinding (b) defined when ligand rebinding is favoured in areas containing clustered receptors [65]. By contrast, other authors calculated that receptor clustering should inhibit ligand rebinding compared to scattered receptors, without modifying the microscopic rate constants [60]. Here, a simpler mechanism only based on mass action rules will be retained. Receptor clustering will be supposed to not modify the absolute binding and dissociation rates, but to influence the local concentration of free ligand in two ways. (i) The receptor clusters (H3K9me3 arrays) carried by heterochromatin is a crystal-like insoluble structure which can save the bound ligand from the normal turnover of soluble proteins continuously synthesized and degraded. By this way, the arrays of H3K9me3 can ensure the protection of SUV39H1 by insolubilizing it. (ii) As long as it is sequestered by its reaction product, SUV39H1 is enzymatically inactive, but it nevertheless constitutes a stock of enzyme which can be resolubilized in case of disappearance of H3K9me3 sites, for example following a rise in concentration of demethylating enzymes JMJD2, as observed in [47]. Altogether, these observations allow to rationally design a simple model to explain the resistance of H3K9me3 heterochromatin.

## 4 The modeling tools

The probabilities of the different nucleosome states are given by sets of ordinary differential equations (ODEs). As the number of nucleosomes is large, stochastic approaches like the master equation are not necessary. A particularity of this model is a permutation of relative concentrations depending on the scale considered. The following deterministic treatment mixes single molecule and bulk approaches to analyse the reciprocal influences between individual molecules and the population of molecules. For a given nucleosome in a given



gene, the histone-modifying enzymes appear numerous and can be incorporated into pseudo-first order binding constants. Conversely, because of enzyme rebinding to a fraction of H3K9me3 residues, the concentration of enzymes depends on the huge number of nucleosomes present in the nucleus. The concentration of nucleosomes should now take part to pseudo-first order constants for determining the amount of active enzymes by multiplying the probability of single nucleosome state by the number of nucleosomes. The probability of individual nucleosome state corresponds to the proportion of nucleosomes in this state in the vicinity, and the concentrations of diffusing enzymes determined at the macroscopic level can be incorporated into pseudo-first-order constants in the single molecule treatments. The sequestration of the enzymes by the substrates will be neglected during the enzymatic reactions (large Michaelis constants  $K_M$ ) to not consider zero-order ultrasensitivity mechanisms and better focus on the present model. SUV39H1 is considered as a processive enzyme which has to rebind to the histone after each round of methylation [67]. As the geometry of the nucleosolic and heterochromatin compartments is unknown, sophisticated diffusion schemes will be avoided. The concentration of S-adenosyl-methionine will be considered as non-limiting and the nucleo-cytoplasmic shuttling of SUV39H1 will be considered passive.

## 5 Formal treatment

### 5.1 The actors and nomenclature

Several enzymes have the same H3K9me3-demethylase activity. JMJD2C has been shown involved in the self-renewal of embryonic stem cells [12], but JMJD2B has also been proposed to antagonize pericentric heterochromatin [8] and JMJD2A has been shown to massively demethylate H3K9me3 [47]. As a matter of fact, different enzymes can be used equivalently to facilitate the experimental reprogramming in single cell nuclear transfer experiments, like JMJD2D [3] and JMJD2B [4]. Given the variety of JMJD2 enzymes intervening in the different cellular contexts, they will be collectively named JMJD2. In the same manner, as SUV39H1 and SUV39H2 appear interchangeable [69], they will be gathered under the generic name SUV39H. Although the residue H3K9 exists in many different states, only three will be considered here. Each nucleosome is supposed to switch between 3 possible states: H3K9-dimethylated ( $N_a$ ), H3K9-trimethylated ( $N_b$ ) and H3K9-trimethylated bound to SUV39H ( $N_bS$ ) (Fig.3). For simplicity, the other states of H3K9: monomethylated, unmethylated, or acetylated, are supposed, in a first approximation, to remain in constant ratio relatively to dimethylated H3K9.

### 5.2 Nonlinear dependence on H3K9me3 of heterochromatin condensation

Heterochromatin condensation depends on the density of H3K9me3 and on HP1, without need for complex hierarchical regulations [33]. Several studies pointed the cooperative mechanisms of HP1-mediated clustering of chromatin regions containing H3K9me3 marks [56, 57, 58]. Accordingly, the opposite mark H3K9ac appears excluded from the chromocenters (Fig.S1A). The nucleosome-bridging activity of rapidly moving HP1 tends to bring together regions with high H3K9me3 density and in turn, the higher concentration of H3K9me3 further facilitates HP1 recruitment, thus yielding a self-reinforced loop leading to the coalescence of heterochromatin into chromocenters. This positive feed back underlies the apparent cooperativity of HP1-mediated condensation which introduces a nonlinear dependence on the density of H3K9me3. As a consequence, a decrease of the concentration of H3K9me3 below a certain threshold can induce a dramatic dismantlement of chromocenters. For modeling this nonlinear effect, a theoretical heterochromatin condensation index ( $CI$ ) will be defined to evaluate the effects of H3K9me3 variations on condensation, using a steep Hill function

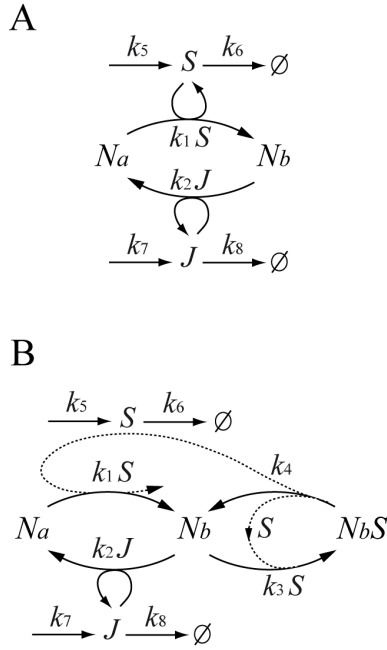
$$CI = \frac{(N_b + N_bS)^{\bar{n}}}{\left(K \frac{N}{HP1}\right)^{\bar{n}} + (N_b + N_bS)^{\bar{n}}} \quad (1)$$

where  $N_b + N_bS$  is the total concentration of H3K9me3, considering that HP1 can bind as well to H3K9me3 in presence and absence of SUV39H.  $N$  is the total concentration of H3K9, HP1 is the concentration, supposed large and fixed, of HP1 $\alpha$  or  $\beta$  molecules.  $K$  is a dissociation constant and  $\bar{n}$  is a Hill coefficient.  $\bar{n}$  and  $K$  can be such that faint modifications of H3K9me3 density can have major effects on condensation. This index will allow to visualize the critical dependence of condensation on the stability of H3K9me3 (Figs.4-6).

### 5.3 Enzymes concentrations

For easier treatment, the proportions of these forms will be used  $x = [N_a]/N$ ,  $y = [N_b]/N$ ,  $z = [N_bS]/N$ , with  $N = [N_a] + [N_b] + [N_bS]$

The schemes with and without SUV39H rebinding are represented in Fig.3.



**Figure 3.** Simplified models of trimethylation/detrimethylation of H3K9, (A) without enzyme sequestration, (B) with enzyme sequestration. A single nucleosome is supposed for simplicity to exist in only 3 forms: H3K9me1/2 ( $N_a$ ), H3K9me3 ( $N_b$ ) or H3K9me3/SUV ( $N_bS$ ), with probabilities  $x, y$ , and  $z$  respectively.  $S$ : SUV39H,  $J$ : JMJD2.

#### 5.4 Without SUV39H rebinding to its product (Fig.3A)

$$\dot{x} = k_2Jy - k_1Sx \quad (2)$$

with  $y = 1 - x$ . The initial steady state conditions are simply  $x = k_2J/(k_1S + k_2J)$ ,  $y = k_1S/(k_1S + k_2J)$ , where the steady state levels of free enzymes are  $S = k_5/k_6$  and  $J = k_7/k_8$ . Let us now suppose that  $S$  can rebind to its product  $N_b$ .

#### 5.5 SUV39H rebinding to its product (Fig.3B)

Now the dynamic system can be described as follows:

$$\dot{x} = k_2Jy - k_1Sx \quad (3a)$$

$$\dot{y} = k_1Sx + k_4z - y(k_2J + k_3S) \quad (3b)$$

$$\dot{z} = k_3Sy - k_4z \quad (3c)$$

The concentration of the free enzymes depends on the concentrations of the relative populations of nucleosomes. These concentrations can be simply obtained by

multiplying the concentration of nucleosomes  $N$  by their state probabilities.

$$\dot{S} = k_5 + k_4Nz - S(k_6 + k_3Ny) \quad (3d)$$

$$\dot{J} = k_7 - k_8J \quad (3e)$$

$x, y$  and  $z$  are probabilities ( $x + y + z = 1$ ), whereas  $S, J$  and  $N$  are concentrations. The switch from probabilistic to quantitative ODEs is obtained by multiplying molecule state probabilities by the concentrations of this molecule. The initial steady state conditions are

$$x_0 = k_4k_2J_0/D \quad (4a)$$

$$y_0 = k_4k_1S_0/D \quad (4b)$$

$$z_0 = k_1k_3S_0^2/D \quad (4c)$$

where  $D$  is the sum of the numerators of  $x_0, y_0, z_0$  and the concentrations of free enzymes are

$$S_0 = \frac{k_5}{k_6} \quad J_0 = \frac{k_7}{k_8} \quad (4d)$$

### 5.6 Perturbative test of these systems

The systems described above are monostable (i.e. have a unique steady state fixed by the relative values of the kinetic constants), but they can have interesting stabilizing effects. The influence of SUV39H rebinding on the resistance to changes can be evaluated using a sudden perturbation like a burst of JMJD2, shifted from  $J_0$  to  $J_1$  while maintaining  $S_0$  constant. This perturbation is biologically relevant because JMJD2 has been shown to have the capacity to dislodge SUV39H from chromatin [47] and it is upregulated during hypoxia [21, 22], in cancer [20, 17] and in association with dedifferentiation (Fig.1).

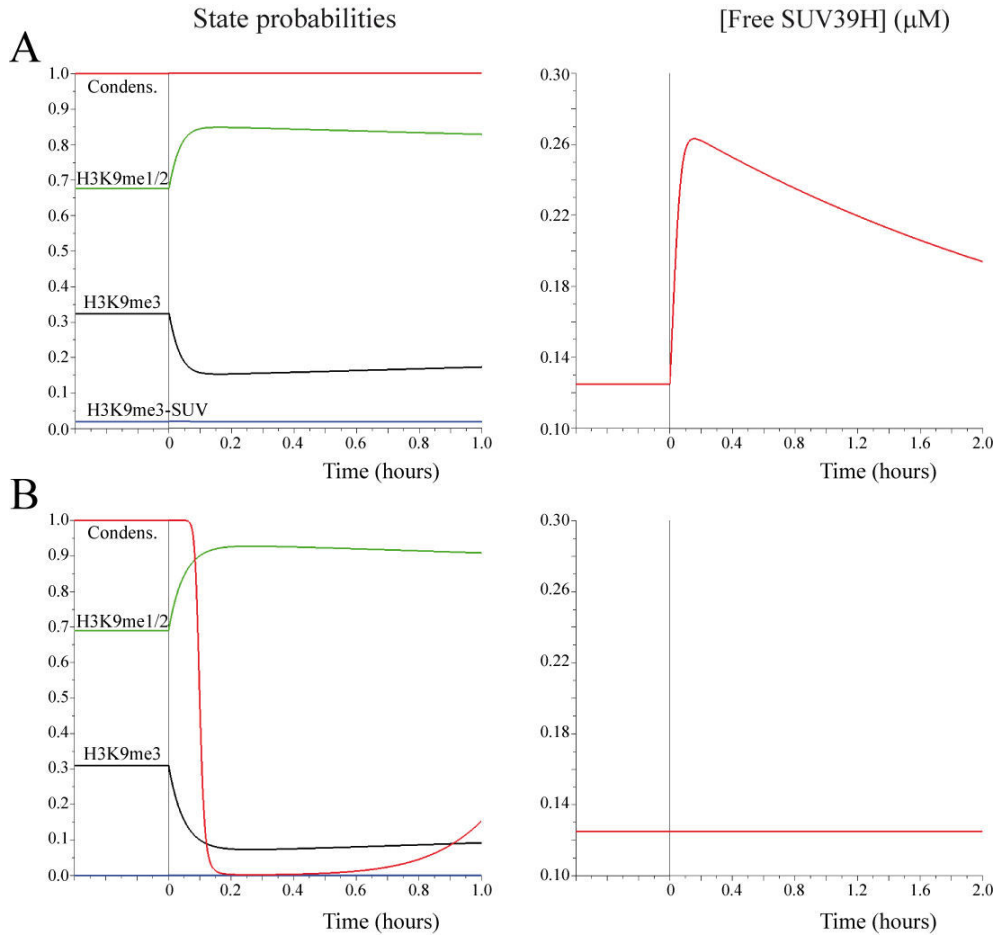
#### 5.6.1 With SUV39H rebinding

Condensation can resist a tenfold increase of JMJD2 (Fig.4). By accumulating SUV39H and by protecting it from the continuous degradation of soluble proteins, the sequestration of SUV39H by heterochromatin generates a stock of enzyme mobilisable in case of demethylation. A peak of JMJD2 demethylases triggers an outburst of soluble SUV39H that can in turn strongly counteract demethylation, even when keeping constant the rates of synthesis and degradation of SUV39H. For this effect, there is no need for H3K9me3 to be the predominant mark, nor that all H3K9me3 moieties are occupied by SUV39H.

### 5.6.2 Without SUV39H rebinding

When SUV39H does not rebind to its product, the degree of condensation dramatically drops (Fig.4B) following JMJD2 increase. As this system is monostable, the initial condensation should be recovered sooner or

later with the limited number of actors taken into account here, but a too long period of decondensation in the cell can in practice offer the opportunity to other mechanisms to modify the cellular state by derepressing unwanted gene expression.



**Figure 4.** Influence of the rebinding activity of SUV39H on nonlinear condensation visualized using the realistic parameters listed in SI-B. Identical bursts of JMJD2 are applied at time 0 in (A) with SUV39H rebinding to H3K9me3 and in (B) without rebinding ( $k_3 = 0$ ) while keeping constant the other parameters.

## 5.7 Possible additional effects

By itself, the phenomenon of enzyme rebinding is sufficient to explain the resistance of heterochromatin to stochastic pulses of demethylation; but additional parameters could complete this mechanism, such as the slow exchanges of SUV39H between heterochromatin niches and euchromatin located in the rest of the nucleosol, which can confine free SUV39H1 in heterochromatin and prevent euchromatin modification.

### 5.7.1 Confinement of the SUV39H bursts in chromocenters

This possibility is based on the high receptor density which can restrict the exchanges between chromocenters

and the surrounding nucleosol. Homogeneous chromatin domains can form functional "niches" in which molecular movements are strongly slowed. This has been postulated for small metabolites [70] and is naturally expected for bulky enzymes and enzyme complexes. Slow protein diffusion has been revealed by fluorescence microscopy techniques and attributed to molecular crowding in heterochromatin areas [71], where phenomena like hopping between clustered binding sites, cage effects and collisions with obstacles, are supposed to be much more frequent [72]. But the consequence of this situation on molecular binding is far from consensual. Slow diffusion is expected to decrease the frequency of encounter complexes, but molecular crowding is also expected to favour the binding of the encounter complexes, making difficult

to predict the global result of these opposite influences [73]. In fact, dense obstacles can slow diffusion but are unable by themselves to create an enrichment of the free ligand in a particular compartment at equilibrium. However, high local concentration can be obtained transiently through a bottleneck effect. If the translocation rate between chromatin niches and the general nucleosol is low enough, transient rises of free SUV39H are obtained in the niche following a sudden release of SUV39H from H3K9me3 sites. For a minimal model in which the phenomenon of hopping is restricted to SUV39H, the system previously described should be completed as follows. We define  $S^G$  as the general concentrations of SUV39H in the nucleus,  $S$  its local concentrations in the chromocenters and  $k_9$  the symmetric translocation rate between the general and chromocenter compartments. The association rates used in the model takes crowding, supposed to be constant, into account. Eq.(3d) should be replaced by two equations.

$$\dot{S} = N(k_4z - k_3Sy) - k_9(S - S^G) \quad (5a)$$

$$\dot{S}^G = k_5 - k_6S^G + k_9(S - S^G) \quad (5b)$$

and the initial conditions take the new values

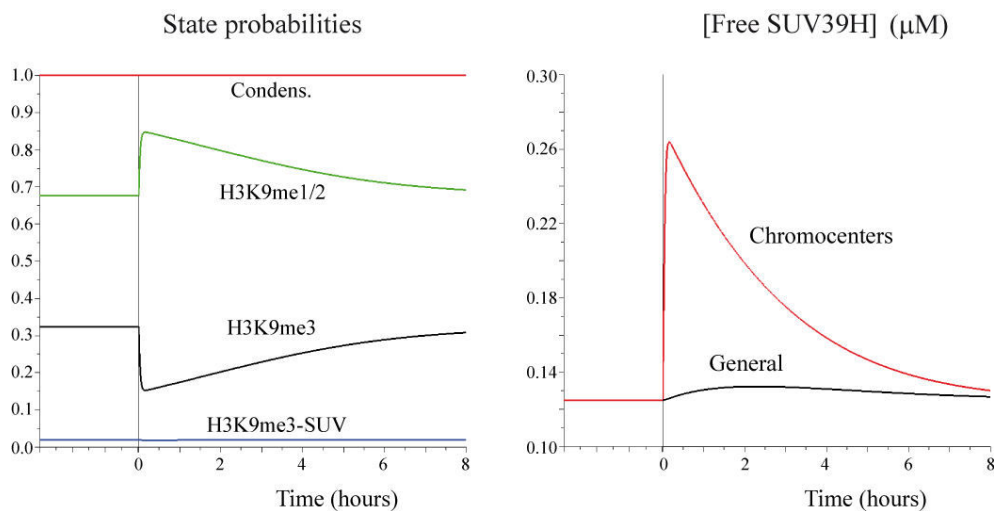
$$x_0 = k_2k_4k_6^2k_7/D \quad (6a)$$

$$y_0 = k_1k_4k_5k_6k_8/D \quad (6b)$$

$$z_0 = k_1k_3k_5^2k_8/D \quad (6c)$$

where  $D$  is the sum of the numerators.

Given the large amount of enzymes trapped in heterochromatin, the slow export rate of enzymes from chromatin niches to the general nucleosol creates a bottleneck effect confining the outbursts of free SUV39H (Fig.5), thus preventing accidental methylation of euchromatin. The lowest is the (unknown) rate constant  $k_9$ , the strongest is this effect.



**Figure 5.** Following a burst of JMJD2 at time 0, the reactive burst of free SUV39H is expected to remain confined in the chromocenters through a bottleneck effect in case of low exchange rate between the chromocenters and the nucleosol. Such a mechanism would be an additional advantage of heterochromatin segregation, restricting methylation to the chromocenters and minimizing the risk of H3K9 methylation of euchromatin.

### 5.7.2 H3K9me3-HP1-SUV39H ternary complexes

The involvement of HP1 in the binding of SUV39H heterochromatin seems difficult to establish experimentally. It is supported by certain studies but not by others (Section 2.3). A recent unifying study proposed that SUV39H needs HP1 at low concentration but becomes self-sufficient at high concentration [74]. A participation of HP1 in the recruitment of SUV39H would be interesting during the establishment of heterochromatin as it would generate a complex cooperative behavior. The

compaction of H3K9me3-rich chromosome regions can be driven by the simple bridging action of HP1 $\alpha/\beta$  following the minimal model of compaction of [75], and could in turn intensify the recruitment of SUV39H, further increasing the density of H3K9me3, thereby recruiting more HP1 bridges, in a circular self-stabilizing circuit similar to the positive feedback loop of [76], accentuating the spatial exclusion between H3K9me3 and H3K9ac-rich regions.

## 6 Comparison with previous models

### 6.1 Positive vs negative feedbacks

The earlier models of recruitment of chromatin-modifying enzymes mediated by their own products, were positive feedbacks [38, 43, 77], whose ultrasensitivity and capacity to generate bistable states are well established. Positive feedbacks are particularly appropriate for the establishment, replication copying and mitotic memory of heterochromatin, while negative feedbacks rather ensure the stability of established marks, for instance in a life-long manner in post-mitotic cells. Positive and negative feedbacks can of course coexist in real systems. Precisely, the present model combines a positive feedback involved in the establishment of H3K9me3 heterochromatin through the mutual enforcement of H3K9me3 and SUV39H concentrations, and a negative feedback in case of demethylation by a reactive burst of soluble SUV39H. The positive feedback has two main effects illustrated in the simulation shown in Fig.6. The increase of H3K9me3 is slower because of the enzymatic inactivity of SUV39H trapped on H3K9me3, but this mechanism allows the generation of a stock of heterochromatin-bound SUV39H consistent with the potent accumulation of insoluble SUV39H1 detected in Fig.2. The slower activity of SUV39H imposed by its rebinding is related to the classical treatment of sequestration in enzymology:

$$v = k_{cat}[SUV]_{tot} \frac{\frac{Ny}{K_M}}{1 + \frac{Ny}{K_M} + \frac{Nz}{K_d}} \quad (7)$$

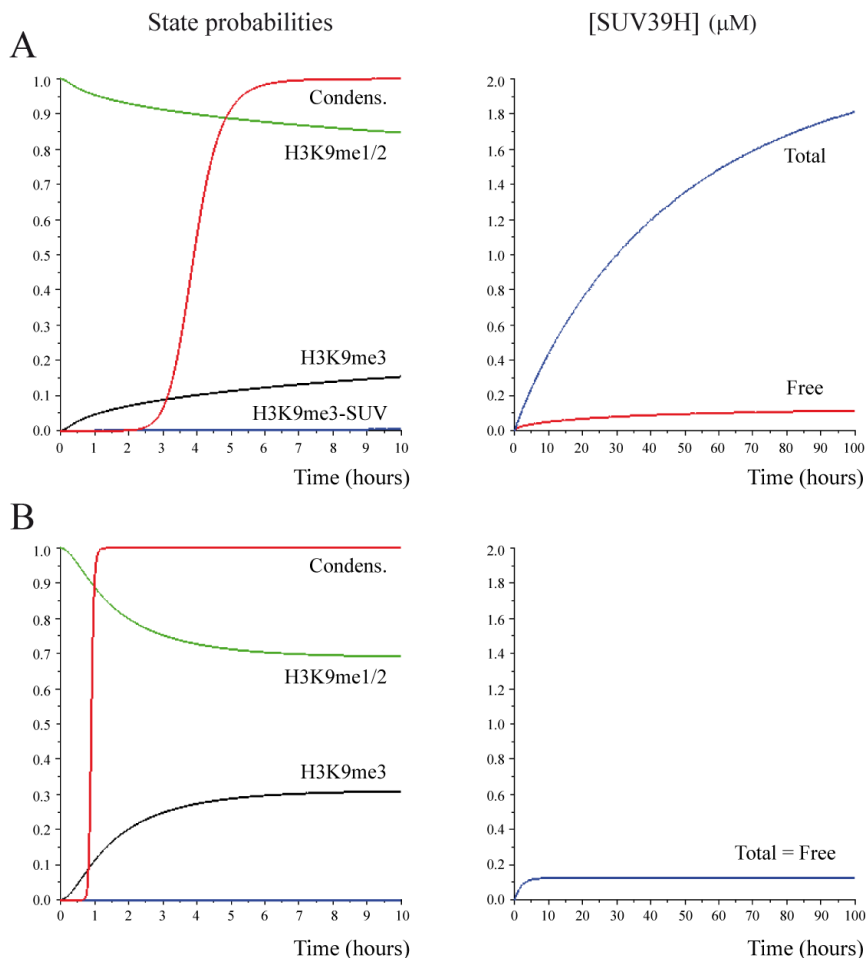
with  $K_M = k_{cat}/k_1$  and  $K_d = k_3/k_4$  (Fig.3).

But this decrease of the net enzyme activity is compensated by its accumulation which allows, by negative feedback, to robustly stabilize heterochromatin by absorbing stochastic bursts of demethylation, with a strength transiently proportional to the intensity of demethylation.

### 6.2 Comparison with the model of nucleation and looping

The most recent and comprehensive model of pericentric heterochromatin formation is centered on the most immobile fraction of SUV39H anchored in chromocenters [5]. It is postulated in the mechanism of nucleation and looping that fixed SUV39H methylates H3K9 by chromatin looping. This view was suggested by an experiment of anchorage of SUV39H in the nuclear lamina which expectedly caused an enrichment of H3K9me3 in the perinuclear area [5]. The alternative mechanism described here does not exclude this possibility, but is also compatible with other modes of chromocenter formation without anchorage, for example through the progressive merging of H3K9me3 regions, as described in [78]. The cooperative mechanism of chromatin condensation mediated by HP1 [56, 57, 58] predicts a H3K9me3 threshold for chromocenter formation. The present model can explain both the formation of chromocenters and their subsequent maintenance, two aspects recently shown separable [1].

The role of SUV39H rebinding to H3K9me3, which is central in the present study, has been minimized in [5] by arguing that the level of H3K9me3 is only slightly lower outside the chromocenters compared to chromocenters. The immunostaining of H3K9me3 and H3K9ac shown in Fig.S1A are clearly different in and out of the chromocenters. In addition, the global level of H3K9me3 could not be the only parameter intervening in chromocenters. In particular, the distribution of H3K9me3 along the chromosomes is different in chromosome regions containing repetitive and nonrepetitive DNA. The homogeneous repetitive organization of satellite DNA is prone to form large self-stabilized domains, whereas scattered H3K9me3 islands could be unable to create diffusion niches. Accordingly, long arrays of tandem repeats have long been shown efficient to create silenced heterochromatin, even if they are unrelated to natural satellite DNA [79, 80]. The spontaneous coalescence of heterochromatic structures sharing common interaction partners can be a spontaneous physical process which does not require the assistance of additional mechanisms [76, 33], suggesting that the tandem repeat organization of satellite DNA is crucial for monotonous heterochromatin.



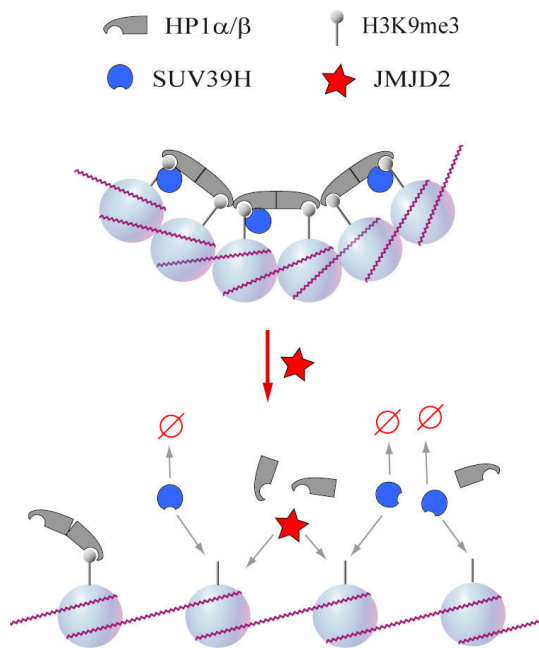
**Figure 6.** Comparative accumulation of SUV39H and H3K9me3 with (A) and without (B) rebinding. (A) The mutual enforcement of H3K9me3 and SUV39H leads to a slow but extensive accumulation of total SUV39H. (B) In the purely theoretical hypothesis of an absence of rebinding of SUV39H to H3K9me3, the accumulation of H3K9me3 and condensation would be faster but would not generate a stock of SUV39H. These simulations use the same set of equations Eqs.(1)-(4) and the same parameters (SI-B) as previously, but with no initial H3K9me3. The total concentration of SUV39H is given by  $S + Nz$ .

## 7 Conclusions

The loss of heterochromatin is critical both in cancer and aging [81, 5]. The simple model proposed here can greatly contribute to the remarkable stability of H3K9me3 heterochromatin, securing the maintenance of differentiated cellular states and increasing the lifespan of adult vertebrates. The sequestration of SUV39H on H3K9me3 heterochromatin can regulate its local concentration by two means, possibly overlapping: (i) by saving it from the particular unstability of chromatin modifying enzymes [82] (which is particularly clear for SUV39H [19, 48, 6]) and (ii) by keeping it in chromatin niches. In turn, the high local concentration of SUV39H is expected to increase that of H3K9me3. These mechanisms are less demanding in term of biochemical conditions than the positive feedback models of heterochromatin spreading, mediated by subtle allosteric changes and by simul-

taneous physical contacts between several nucleosomes and modifying machineries. In the present model, the trapping of SUV39H on heterochromatin should not be conceived as a shield because (i) it is bound to a minor fraction of nucleosomes, and (ii) a shield requires immobile molecules to forbid the action of JMJD2. Instead, the binding of SUV39H to heterochromatin is a mean to increase H3K9me3 and create a latent source of free enzyme while maintaining constant its synthesis. This mechanism of "resistance to change" would authorize cellular reprogramming only upon sustained, non-random, upregulation of demethylases in the cell (Fig.7). High local concentration is recognized as a fundamental strategy of life [84], but the concept of local concentration is often corrupted by a confusion between the concentration of free and bound molecules. The persistent sequestration of an enzyme with clustered receptors inevitably increases its local concentration, but without

any functional consequence on the free enzyme, so that the modification of new substrates still requires the import of more enzymes. By itself, the phenomenon of enzyme trapping corresponds to a functional inactivation of the enzyme by sequestration, forbidding the modification of other substrates. But these enzymes can be massively de-sequestered in case of bursts of JMJD2, for example during intermittent hypoxia, if not too prolonged. Considering the number of reported cases of protein sequestration in insoluble structures in the cell, this model could be generalizable to a variety of contexts, but the impressive arrays of nucleosomes in the nucleus appear ideally suited for the evolutionary selection of such a mechanism. H3K9me3 heterochromatin maintenance can also concern certain genes prepared for long-term transcriptional repression which are relocated in chromocenters [30, 32], where they can benefit from the higher local concentration of SUV39H. This mechanism is economic in that it necessitates a minimal number of ingredients to work. For instance it does not require a specific machinery of protein degradation, but simply the escape from normal turnovers of soluble protein by insolubilization on chromatin.



**Figure 7.** Simplified scheme of the contribution of heterochromatin-bound SUV39H to the resistance of H3K9me3. The local accumulation of SUV39H can serve as a source of free SUV39H which can counteract demethylation unless the input of demethylating enzyme is strong and sustained enough, opening the way to reprogramming [4]. The kinetic competition between the degradation ( $\emptyset$ ) and activity of free SUV39H allows to "sense" the duration of the demethylation phase.

The resistance to degradation of insoluble proteins has long been illustrated by the numerous cases of nat-

ural and pathological aggregative proteins whose cellular content increases without modifying their expression level [85].

As for near all proteins, SUV39H activity is subject to the whole panoply of regulatory mechanisms of molecular biology (which forbids exhaustive modeling), including synthesis [86], degradation [19, 6], alternative splicing, protein methylation [87, 6], phosphorylation [48], cis-trans-isomerization [19] etc, which are likely to play refined regulatory roles in dividing cells with cycles of chromatin condensation/decondensation. But owing to its simplicity, the minimal model presented here could be an important facet of the simple maintenance of heterochromatin in differentiated cells. This mechanism is consistent with experimental observations and explains how dynamic epigenetic marks can ensure the long-term persistence of chromatin states, in apparent contradiction with the results of FRAP analyses showing that SUV39H interactions with chromatin are not static but dynamic over time scales below the hour.

## 8 Acknowledgements

This work is supported by the Ligue inter-régionale de lutte contre le cancer.

**Supplemental information** includes detailed material and methods, the set of parameter values used for the simulations and microscopy images showing the actors of this study.

## References

- [1] K. Ragnathan, G. Jih, D. Moazed, Epigenetic inheritance uncoupled from sequence-specific recruitment, *Science* 348 (2015) 1258699.
- [2] A.H. Peters, D. O'Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schöfer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia, T. Jenuwein, Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell* 107 (2001) 323-337.
- [3] S. Matoba, Y. Liu, F. Lu, K.A. Iwabuchi, L. Shen, A. Inoue, Y. Zhang, Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation, *Cell* 159 (2014) 884-895.
- [4] J. Antony, F. Oback, L.W. Chamley, B. Oback, G. Laible, Transient JMJD2B-mediated reduction of H3K9me3 levels improves reprogramming of embryonic stem cells into cloned embryos. *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 974-983.
- [5] W. Zhang, J. Li, K. Suzuki, J. Qu, P. Wang, J. Zhou, X. Liu, R. Ren, X. Xu, A. Ocampo, T. Yuan, J. Yang, Y. Li, L. Shi, D. Guan, H. Pan, S. Duan, Z. Ding, M. Li, F. Yi, R. Bai, Y. Wang, C. Chen, F. Yang, X. Li, Z. Wang, E. Aizawa, A. Goebel, R.D. Soligalla, P. Reddy, C.R. Esteban, F. Tang, G.H. Liu, J.C. Belmonte, A Werner syndrome

- stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging, *Science* 348 (2015) 1160-1163.
- [6] B. Lehnertz, Y. Ueda, A.A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein, A.H. Peters, Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin, *Curr. Biol.* 13 (2003) 1192-1200.
- [7] N. Feldman, A. Gerson, J. Fang, E. Li, Y. Zhang, Y. Shinkai, H. Cedar, Y. Bergman, G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis, *Nat. Cell. Biol.* 8 (2006) 188-194.
- [8] R.D. Hawkins, G.C. Hon, L.K. Lee, Q. Ngo, R. Lister, M. Pelizzola, L.E. Edsall, S. Kuan, Y. Luu, S. Klugman, J. Antosiewicz-Bourget, Z. Ye, C. Espinoza, S. Agarwahl, L. Shen, V. Ruotti, W. Wang, R. Stewart, J.A. Thomson, J.R. Ecker, B. Ren, Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells, *Cell Stem Cell.* 6 (2010) 479-491.
- [9] E. Meshorer, T. Misteli, Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7 (2006) 540-546.
- [10] D.C. Kraushaar, K. Zhao, The epigenomics of embryonic stem cell differentiation, *Int. J. Biol. Sci.* 9 (2013) 1134-1144.
- [11] S. Efroni, R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D.J. Hoepfner, C. Dash, D.P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R.D. McKay, K.H. Buetow, T.R. Gingeras, T. Misteli, E. Meshorer, Global transcription in pluripotent embryonic stem cells, *Cell Stem Cell.* 2 (2008) 437-447.
- [12] Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, J. George, H.H. Ng, Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells, *Genes Dev.* 21 (2007) 2545-2557.
- [13] A.H. Peters, S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H. Martens, T. Jenuwein, Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin, *Mol. Cell.* 12 (2003) 1577-1189.
- [14] O.G. McDonald, H. Wu, W. Timp, A. Doi, A.P. Feinberg, Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 867-874.
- [15] G. Flouriot, G. Huet, F. Demay, F. Pakdel, N. Boujrad, D. Michel, The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications, *Biochem. J.* 461 (2014) 257-268.
- [16] G.J. Pageau, L.L. Hall, S. Ganesan, D.M. Livingston, J.B. Lawrence, The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers, *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 628-633.
- [17] R.B. Slee, C.M. Steiner, B.S. Herbert, G.H. Vance, R.J. Hickey, T. Schwarz, S. Christan, M. Radovich, B.P. Schneider, D. Schindelbauer, B.R. Grimes, Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability, *Oncogene* 31 (2012) 3244-3253.
- [18] M. Braig, S. Lee, C. Loddenkemper, C. Rudolph, A.H. Peters, B. Schlegelberger, H. Stein, B. Dörken, T. Jenuwein, C.A. Schmitt, Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development, *Nature* 436 (2005) 660-665
- [19] P. Khanal, G. Kim, S.C. Lim, H.J. Yun, K.Y. Lee, H.K. Choi, H.S. Choi, Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates the stability of SUV39H1 to promote tumorigenesis in breast cancer, *FASEB J.* 27 (2013) 4606-4618.
- [20] G. Liu, A. Bollig-Fischer, B. Kreike, M.J. van de Vijver, J. Abrams, S.P. Ethier, Z.Q. Yang, Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer, *Oncogene* 28 (2009) 4491-4500.
- [21] A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen, Hypoxia-inducible histone lysine demethylases: Impact on the aging process and age-related diseases, *Aging Dis.* 7 (2016) 180-200.
- [22] J.C. Black, E. Atabakhsh, J. Kim, K.M. Biette, Van C. Rechem, B. Ladd, P.D. Burrowes, C. Donado, H. Mattoo, B.P. Kleinstiver, B. Song, G. Andriani, J.K. Joung, O. Iliopoulos, C. Montagna, S. Pillai, G. Getz, J.R. Whetstone, Hypoxia drives transient site-specific copy gain and drug-resistant gene expression, *Genes Dev.* 29 (2015) 1018-1031.
- [23] C. Jehanno, G. Flouriot, F. Nicol-Benoît, Y. Le Page, P. Le Goff, D. Michel, Envisioning metastasis as a trans-differentiation phenomenon clarifies discordant results on cancer, *Breast Dis.* 36 (2016) 47-59.
- [24] N. Gilbert, S. Boyle, H. Sutherland, J. de Las Heras, J. Allan, T. Jenuwein, W.A. Bickmore, Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1, *EMBO J.* 22 (2003) 5540-5550.
- [25] J. Zhu, M. Adli, J.Y. Zou, G. Verstappen, M. Coyne, X. Zhang, T. Durham, M. Miri, V. Deshpande, P.L. De Jager, D.A. Bennett, J.A. Houmard, D.M. Muoio, T.T. Onder, R. Camahort, C.A. Cowan, A. Meissner, C.B. Epstein, N. Shores, B.E. Bernstein, Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues, *Cell* 152 (2013) 642-654.
- [26] J. Kim, H. Kim, Recruitment and biological consequences of histone modification of H3K27me3 and H3K9me3, *ILAR J.* 53 (2012) 232-239.
- [27] N.A. Hathaway, O. Bell, C. Hodges, E.L. Miller, D.S. Neel, G.R. Crabtree, Dynamics and memory of heterochromatin in living cells, *Cell* 149 (2012) 1447-1460.
- [28] A.V. Probst, G. Almouzni, Pericentric heterochromatin: dynamic organization during early development in mammals, *Differentiation* 76 (2008) 15-23.
- [29] I. Solovei, M. Kreysing, C. Lanctôt, S. Kösem, L. Peichl, T. Cremer, J. Guck, B. Joffe, Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution, *Cell* 137 (2009) 356-368.
- [30] M.R. Hübner, D.L. Spector, Chromatin dynamics, *Annu. Rev. Biophys.* 39 (2010) 471-489.
- [31] A. Bulut-Karslioglu, I.A. De La Rosa-Velázquez, F. Ramirez, M. Barenboim, M. Onishi-Seebacher, J. Arand, C. Galán, G.E. Winter, B. Engist, B. Gerle, R.J. O'Sullivan, J.H. Martens, J. Walter, T. Manke, M. Lachner, T. Jenuwein, Suv39h-dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells, *Mol. Cell.* 55 (2014) 277-290.



- [32] V. Guasconi, L.L. Pritchard, L. Fritsch, L.D. Mesner, C. Francastel, A. Harel-Bellan, S. Ait-Si-Ali, Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells, *Epigenetics* 5 (2010) 704-709.
- [33] K. Hiragami-Hamada, S. Soeroes, M. Nikolov, B. Wilkins, S. Kreuz, C. Chen, I.A. De La Rosa-Velázquez, H.M. Zenn, N. Kost, W. Pohl, A. Chernev, D. Schwarzer, T. Jenuwein, M. Lorincz, B. Zimmermann, P.J. Walla, H. Neumann, T. Baubec, H. Urlaub, W. Fischle, Dynamic and flexible H3K9me3 bridging via HP1 $\beta$  dimerization establishes a plastic state of condensed chromatin, *Nat. Commun.* 7 (2016) 11310.
- [34] R.T. Kamakaka, Heterochromatin: proteins in flux lead to stable repression, *Curr. Biol.* 13 (2003) R317-9.
- [35] F. Nicol-Benoit, P. Le-Goff, Y. Le-Dréan, F. Demay, F. Pakdel, G. Flouriot, D. Michel D, Epigenetic memories: structural marks or active circuits? *Cell. Mol. Life Sci.* 69 (2012) 2189-2203.
- [36] J. Huang, S.L. Berger, The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins, *Curr Opin Genet Dev.* 18 (2008) 152-158.
- [37] T. Cheutin, A.J. McNairn, T. Jenuwein, D.M. Gilbert, P.B. Singh, T. Misteli, Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding, *Science* 299 (2003) 721-725.
- [38] I.B. Dodd, M.A. Micheelsen, K. Sneppen, G. Thon, Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification, *Cell* 129 (2007) 813-822.
- [39] A.V. Probst, E. Dunleavy, G. Almouzni, Epigenetic inheritance during the cell cycle, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 (2009) 192-206.
- [40] D. Moazed, Mechanisms for the inheritance of chromatin states, *Cell* 146 (2011) 510-518.
- [41] B. Zhu, D. Reinberg, Epigenetic inheritance: untested? *Cell Res.* 21 (2011) 435-441.
- [42] C. Hodges, G.R. Crabtree, Dynamics of inherently bounded histone modification domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012) 13296-13301.
- [43] D. David-Rus, S. Mukhopadhyay, J.L. Lebowitz, A.M. Sengupta, Inheritance of epigenetic chromatin silencing, *J Theor Biol.* 258 (2009) 112-120.
- [44] M.M. Müller, B. Fierz, L. Bittova, G. Liszczak, T.W. Muir, A two-state activation mechanism controls the histone methyltransferase Suv39h1, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 188-193.
- [45] K. Müller-Ott, F. Erdel, A. Matveeva, J.P. Mallm, A. Rademacher, M. Hahn, C. Bauer, Q. Zhang, S. Kaltofen, G. Schotta, T. Höfer, K. Rippe, Specificity, propagation, and memory of pericentric heterochromatin, *Mol. Syst. Biol.* 10 (2014) 746.
- [46] F. Erdel, E.C. Greene, Generalized nucleation and looping model for epigenetic memory of histone modifications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113 (2016) E4180-E4189.
- [47] J.C. Black, A. Allen, C. Van Rechem, E. Forbes, M. Longworth, K. Tschöp, C. Rinehart, J. Quiton, R. Walsh, A. Smallwood, N.J. Dyson, J.R. Whetstone, Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 $\gamma$  during cell cycle progression, *Mol. Cell* 40 (2010) 736-748.
- [48] S.H. Park, S.E. Yu, Y.G. Chai, Y.K. Jang, CDK2-dependent phosphorylation of Suv39H1 is involved in control of heterochromatin replication during cell cycle progression, *Nucl. Acids Res.* 42 (2014) 6196-6207.
- [49] I.M. Krouwels, K. Wiesmeijer, T.E. Abraham, C. Molenaar, N.P. Verwoerd, H.J. Tanke, R.W. Dirks, A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain, *J. Cell. Biol.* 170 (2005) 537-549.
- [50] M. Lachner, D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, T. Jenuwein, Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins, *Nature* 410 (2001) 116-120.
- [51] A.J. Bannister, P. Zegerman, J.F. Partridge, E.A. Miska, J.O. Thomas, R.C. Allshire, T. Kouzarides, Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain, *Nature.* 410 (2001) 120-124.
- [52] J. Nakayama, J.C. Rice, B.D. Strahl, C.D. Allis, S.I. Grewal, Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, *Science* 292 (2001) 110-113.
- [53] S. Haldar, A. Saini, J.S. Nanda, S. Saini, J. Singh, Role of Swi6/HP1 self-association-mediated recruitment of Ctr4/Suv39 in establishment and maintenance of heterochromatin in fission yeast, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 9308-9320.
- [54] T. Wang, C. Xu, Y. Liu, K. Fan, Z. Li, X. Sun, H. Ouyang, X. Zhang, J. Zhang, Y. Li, F. Mackenzie, J. Min, X. Tu, Crystal structure of the human SUV39H1 chromodomain and its recognition of histone H3K9me2/3, *PLoS One* 7 (2012) e52977.
- [55] M. Melcher, M. Schmid, L. Aagaard, P. Selenko, G. Laible, T. Jenuwein, Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression, *Mol. Cell Biol* 20 (2000) 3728-3741.
- [56] D. Canzio, E.Y. Chang, S. Shankar, K.M. Kuchenbecker, M.D. Simon, H.D. Madhani, G.J. Narlikar, B. Al-Sady, Chromodomain-mediated oligomerization of HP1 suggests a nucleosome-bridging mechanism for heterochromatin assembly, *Mol. Cell.* 41 (2011) 67-81.
- [57] V.B. Teif, N. Kepper, K. Yserentant, G. Wedemann, K. Rippe, Affinity, stoichiometry and cooperativity of heterochromatin protein 1 (HP1) binding to nucleosomal arrays, *J. Phys. Condens. Matter* 27 (2015) 064110.
- [58] P.J. Mulligan, E.F. Koslover, A.J. Spakowitz, Thermodynamic model of heterochromatin formation through epigenetic regulation, *J. Phys. Condens. Matter* 27 (2015) 064109.
- [59] A.M. Azzaz, M.W. Vitalini, A.S. Thomas, J.P. Price, M.J. Blacketer, D.E. Cryderman, L.N. Zirbel, C.L. Woodcock, A.H. Elcock, L.L. Wallrath, M.A. Shogren-Knaak, Human heterochromatin protein 1 $\alpha$  promotes nucleosome associations that drive chromatin condensation, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 6850-6861.
- [60] B.R. Caré, H.A. Soula, Impact of receptor clustering on ligand binding, *BMC Syst. Biol.* 5 (2011) 48.
- [61] C. DeLisi, F.W. Wiegel, Effect of nonspecific forces and finite receptor number on rate constants of ligand-cell bound-receptor interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (1981) 5569-5572.

- [62] B. Goldstein, R.G. Posner, D.C. Torney, J. Erickson, D. Holowka, B. Baird, Competition between solution and cell surface receptors for ligand. Dissociation of hapten bound to surface antibody in the presence of solution antibody, *Biophys. J.* 56 (1989) 955-966.
- [63] B. Goldstein, M. Dembo, Approximating the effects of diffusion on reversible reactions at the cell surface: ligand-receptor kinetics, *Biophys. J.* 68 (1995) 1222-1230.
- [64] M. Gopalakrishnan, K. Forsten-Williams, M.A. Nugent, U.C. Täuber, Effects of receptor clustering on ligand dissociation kinetics: theory and simulations, *Biophys. J.* 89 (2005) 3686-3700.
- [65] B.C. Lagerholm, N.L. Thompson, Theory for ligand re-binding at cell membrane surfaces, *Biophys. J.* 74 (1998) 1215-1228.
- [66] D. Shoup, A. Szabo, Role of diffusion in ligand binding to macromolecules and cell-bound receptors, *Biophys. J.* 40 (1982) 33-39.
- [67] H.G. Chin, D. Patnaik, P.O. Estéve, S.E. Jacobsen, S. Pradhan, Catalytic properties and kinetic mechanism of human recombinant Lys-9 histone H3 methyltransferase SUV39H1: participation of the chromodomain in enzymatic catalysis, *Biochemistry* 45 (2006) 3272-3284.
- [68] B.D. Fodor, S. Kubicek, M. Yonezawa, R.J. O'Sullivan, R. Sengupta, L. Perez-Burgos, S. Opravil, K. Mechtler, G. Schotta, T. Jenuwein, Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells, *Genes Dev.* 20 (2006) 1557-1562.
- [69] J.C. Rice, S.D. Briggs, B. Ueberheide, C.M. Barber, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Y. Shinkai, C.D. Allis, Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains, *Mol. Cell.* 12 (2003) 1591-1598.
- [70] P. Sassone-Corsi, When metabolism and epigenetics converge, *Science* 339 (2013) 148-150.
- [71] A. Bancaud, S. Huet, N. Daigle, J. Mozziconacci, J. Beaudouin, J. Ellenberg, Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin, *EMBO J.* 28 (2009) 3785-3798.
- [72] F. Erdel, K. Müller-Ott, M. Baum, M. Wachsmuth, K. Rippe, Dissecting chromatin interactions in living cells from protein mobility maps, *Chromosome Res.* 19 (2011) 99-115.
- [73] R.J. Ellis, Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 114-119.
- [74] D. Muramatsu, H. Kimura, K. Kotshiba, M. Tachibana, Y. Shinkai Y. Pericentric H3K9me3 formation by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1. *Cell. Struct. Funct.* (2016).
- [75] J. Johnson, C.A. Brackley, P.R. Cook, D. Marenduzzo, A simple model for DNA bridging proteins and bacterial or human genomes: bridging-induced attraction and genome compaction, *J. Phys. Condens. Matter.* 27 (2015) 064119.
- [76] C.A. Brackley, S. Taylor, A. Papantonis, P.R. Cook, D. Marenduzzo, Nonspecific bridging-induced attraction drives clustering of DNA-binding proteins and genome organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 (2013) E3605-11.
- [77] K. Sneppen, M.A. Micheelsen, I.B. Dodd, Ultrasensitive gene regulation by positive feedback loops in nucleosome modification, *Mol. Syst. Biol.* 4 (2008) 182.
- [78] F. Tessadori, M.C. Chupeau, Y. Chupeau, M. Knip, S. Germann, R. van Driel, P. Fransz, V. Gaudin, Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated Arabidopsis cells, *J. Cell. Sci.* 120 (2007) 1200-1208.
- [79] S. Henikoff, Conspiracy of silence among repeated transgenes, *BioEssays* 20 (1998) 532-535.
- [80] A. Pecinka, N. Kato, A. Meister, A.V. Probst, I. Schubert, E. Lam, Tandem repetitive transgenes and fluorescent chromatin tags alter local interphase chromosome arrangement in Arabidopsis thaliana, *J. Cell. Sci.* 118 (2005) 3751-3758.
- [81] A. Tsurumi, W.X. Li, Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics* 7 (2012) 680-688.
- [82] B. Schwanhäusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, Global quantification of mammalian gene expression control, *Nature* 473 (2011) 337-342.
- [83] L. Bosch-Presegué, H. Raurell-Vila, A. Marazuela-Duque, N. Kane-Goldsmith, A. Valle, J. Oliver, L. Serrano, A. Vaquero, Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection, *Mol. Cell* 42 (2011) 210-223.
- [84] S. Oehler, B. Müller-Hill, High local concentration: a fundamental strategy of life, *J. Mol. Biol.* 395 (2010) 242-253.
- [85] D. Michel, Modeling generic aspects of ideal fibril formation, *J. Chem. Phys.* 144 (2016) 035101.
- [86] H. Zheng, L. Chen, W.J. Pledger, J. Fang, J. Chen, p53 promotes repair of heterochromatin DNA by regulating JMJD2b and SUV39H1 expression, *Oncogene* 33 (2013) 734-744.
- [87] A. Vaquero, M. Scher, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, L. Serrano, D. Reinberg, SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation, *Nature* 450 (2007) 440-444.

# Supplemental Information

## A Materials and Methods

### A.1 Cell lines and plasmid transfection

MCF7, MDA-MB-231, HepG2, HeLa and 3T3 cells were routinely cultured in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% FBS (biowest) and antibiotics (Invitrogen) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. MCF7 cells stably expressing empty construct or deleted form of MKL1 (MKL1- $\Delta$ N200) construct were established using the T-Rex subclones system [1]. MKL1- $\Delta$ N200 expression was performed by treatment with 1  $\mu$ g/ml tetracyclin, in DMEM supplemented with 2% of FBS 48h prior to the experiment. For plasmids transfection, 0.5  $\mu$ g of DNA was used per well in 24-wells plate, using JetPEI according to manufacturer's instructions. The GFP-tagged SUV39H1 plasmids were kindly provided by Dr Krouwels. GFP-HP1alpha was a gift from Tom Misteli (Addgene plasmid # 17652). JMJD2-GFP plasmids was kindly provided by Dr Nicholas Shukeir. Mutagenesis was performed using Quickchange primer Design from Agilent.

### A.2 RNA extraction and qPCR

RNA extractions were performed using RNeasy kit (Qiagen). Retrotranscription was performed on 1  $\mu$ g of RNA with random primer using MMLV reverse transcriptase. Quantitative RT-PCRs were performed using the iQ<sup>TM</sup> SYBR-Green supermix from BioRad (BioRad, Hercules, CA, USA). The primer sequences used for SUV39H1 qPCR were: forward ACCTGGTTGAGGGT-GATGC and reverse CAGAAGGCCAAGCAGAGG.

### A.3 Immunoblotting

For endogenous SUV39H1 immunoblotting, cells were lysed by sonication in 2X Laemmli buffer. Transfected cells expressing HA-tagged SUV39H1 or JMJD2C cells were lysed for 1 h on ice in lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% (v/v) Nonidet P-40, pH 8.0) supplemented with Complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics S.A., Meylan, France). Soluble and insoluble proteins were separated after a 30-min centrifugation at 14 000 g. The various protein extracts were loaded on SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Millipore). The blots were probed with primary antibodies: H3 (ab 1791, Abcam), HA (Y11, Santa Cruz biotechnology), SUV39H1 (D11B6, Cell signaling)

### A.4 Immunofluorescence

Cells were plated on cover slides in 24 well plates. After treatment, cells were fixed with PBS containing

4% paraformaldehyde for 10 min, and then permeabilized in PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min. The cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (1/1000) in PBS/3% FCS. Incubation with secondary antibody was performed for 2 h at room temperature. Images were obtained with an Imager Z1 ApoTome AxioCam (Zeiss) microscope. The comparisons between cells and conditions were made on average signals per surface unit (kept identical between the different cells) and quantified from images obtained with identical time exposures. Immunofluorescence was scored for at least 20 cells by image themselves obtained using ImageJ from different experiments. Primary antibodies used are H3K9Ac (ab12179), H3K9me3 (ab8898) and JMJD2C (ab27532) from Abcam, SUV39H1 (D11B6) from Cell Signaling, FLAG-tag (F3165) from Sigma, HA-tag from Santa Cruz (sc805).

## B Values used for the simulations shown in figures

Table 1 – Values used for the simulations shown in figures.

Parameter	Value	Reference
Nucleosome concentration in the nucleus	100 $\mu\text{M}$	Calculated <sup>a</sup>
( $k_1$ ) SUV39H catalytic efficiency	0.18/ $\mu\text{M}\cdot\text{min}$	[2] <sup>b</sup>
( $k_2$ ) JMJD2 catalytic efficiency	0.04/ $\mu\text{M}\cdot\text{min}$	[3, 4] <sup>b, c</sup>
( $k_3$ ) $k_{on}$ of SUV39H1	1.05 / $\mu\text{M}\cdot\text{min}$	[5]
( $k_4$ ) $k_{off}$ of SUV39H1	2 /min	[5] <sup>d</sup>
( $k_6$ ) SUV39H degradation rate	0.008 /min	[6]
( $k_8$ ) JMJD2 degradation rate	0.008 /min	[7] <sup>e</sup>
( $k_5$ ) SUV39H synthesis rate	0.001 $\mu\text{M}/\text{min}$	Deduced from its concentration <sup>f</sup>
( $k_7$ ) JMJD2 synthesis rate	0.01 $\mu\text{M}/\text{min}$	To give 30% H3K9me3 [8] <sup>g</sup>
( $k_9$ ) Chromocenter-nucleosol exchange rate	$10^{-3}/\text{min}$	Arbitrary <sup>h</sup>
( $K/\text{HP1}$ ) Condensation threshold constant	0.1	For convenience
( $\bar{n}$ ) Hill coefficient of cooperative condensation	20	For convenience

### Values estimation

- <sup>a</sup> A nucleosome every 200 bp along a  $2 \times 3 \times 10^9$  bp-long diploid DNA in a spherical nucleus of  $500 \mu\text{m}^3$ , yields 100  $\mu\text{M}$  nucleosomes.
- <sup>b</sup> For a given nucleosome, the pseudo first order enzyme binding rate is  $k_a E$  (where  $k_a$  is the second-order association constant and  $E$  is the concentration of the free enzyme). This rate should be weighted by the probability that once bound, the enzyme catalyses the reaction (rate constant  $k_c$ ) instead of dissociating from the nucleosome (rate constant  $k_d$ ). The probability of this event is  $k_c/(k_c + k_d)$ . Hence, for a given nucleosome, the resulting global transformation rate is

$$kE = k_a E \frac{k_c}{k_c + k_d} = \frac{k_c}{K_M} E$$

This linear approximation does not take enzyme sequestration into account, but the error is mod-

erate for enzymes with relatively large  $K_M$  values (around 30-40  $\mu\text{M}$ ).

- <sup>c</sup> The catalytic efficiency of JMJD2 is set from the measurements for JMJD2C (0.036/ $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ) [3], for JMJD2D (0.045/ $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ) and JMJD2A (0.031/ $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ ) [4].
- <sup>d</sup> The on and off rates for the interaction between SUV39H1 and H3K9me3 are derived from the fluorescence microscopy analyses of [5]. The off rate corresponds to the moderately mobile fraction (class III) of SUV39H defined in [5].
- <sup>e</sup> Half-lives of 90 [7], 120 [9] and 180 minutes [10], have been found for JMJD2A and 60 minutes for JMJD2B [11], so a median value of 90 min is selected for the simulation.
- <sup>f</sup> Given the degradation rate of SUV39H, its synthesis rate is determined to be compatible with the steady state (synthesis/degradation) concentration of dimers of  $0.05 \mu\text{M}$  [5].
- <sup>g</sup> Given the previous values, the collective synthe-

sis rate of JMJD2 enzymes is adjusted to yield a steady state level of trimethylated H3K9 of 30% according to [8].

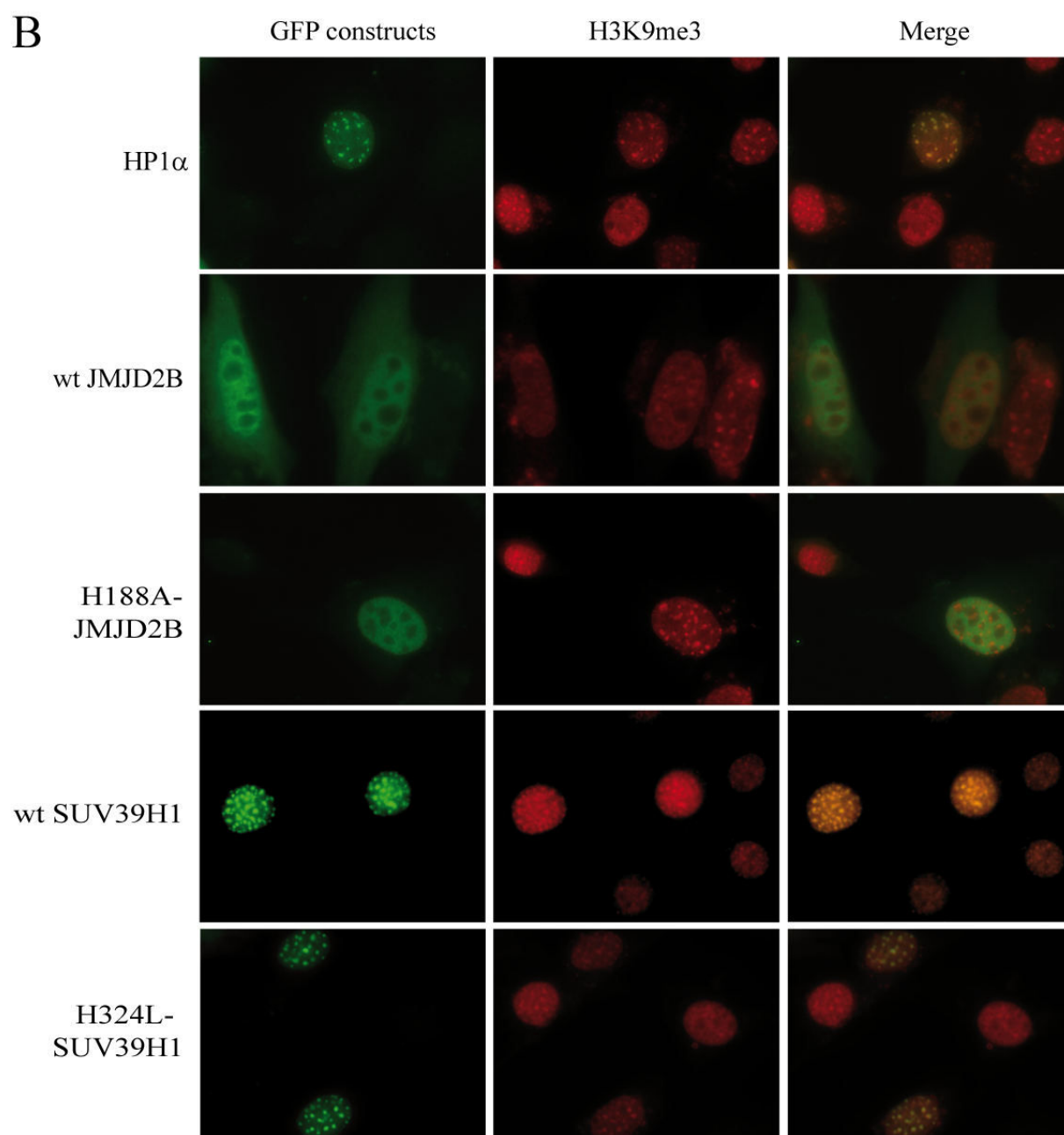
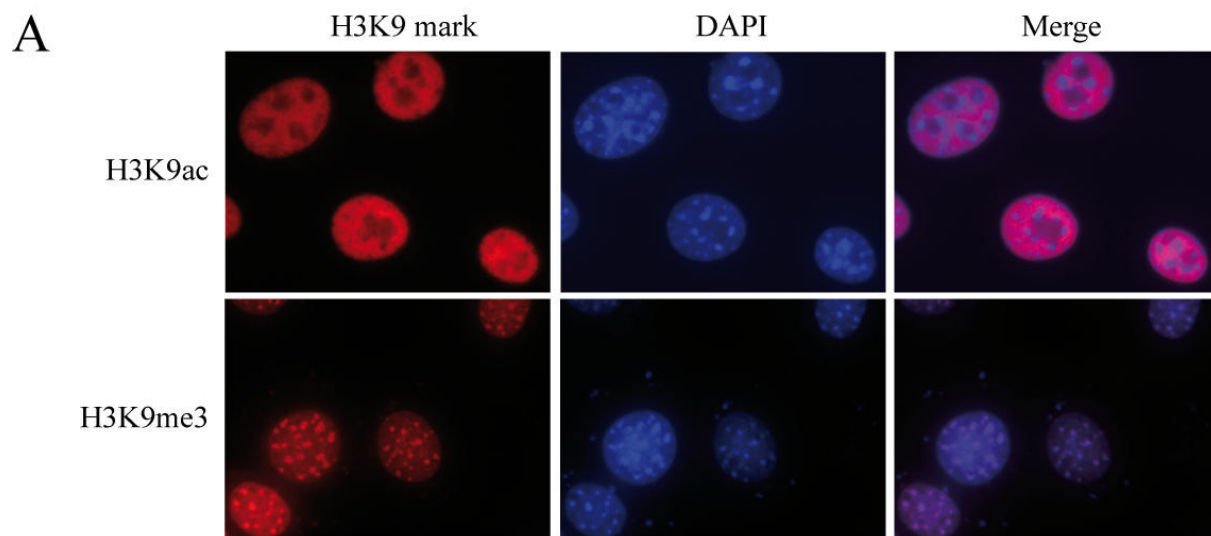
- <sup>h</sup> This value is currently unknown. The bottleneck effect described in the article begins at moderate level for relatively low rate constants and increases as this constant decreases.

## C Visualization of the actors of the system

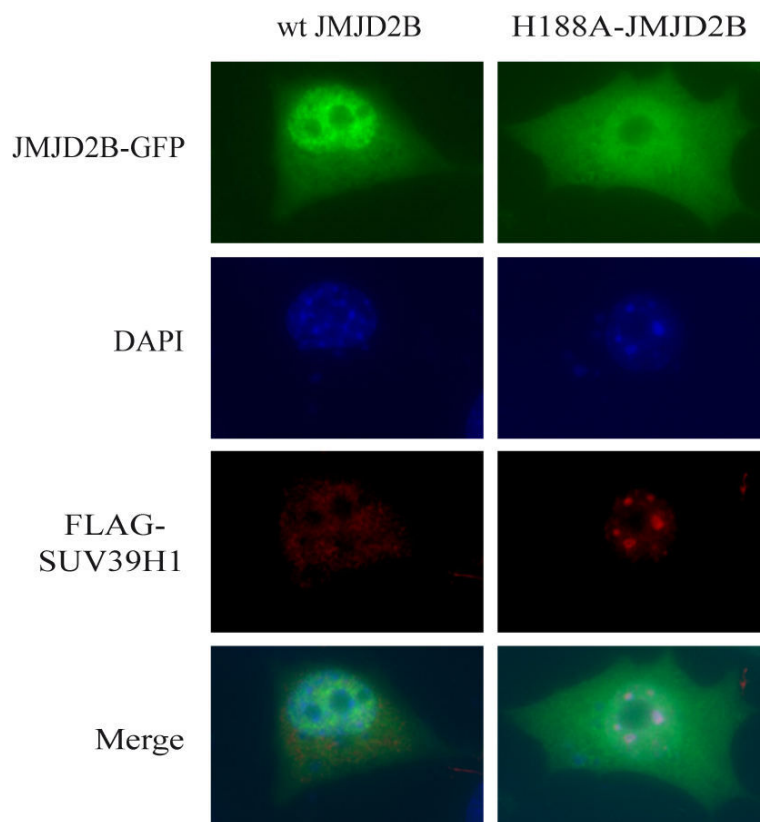
The different actors of the model proposed here are presented in mouse 3T3 cells, in Figs.S1 and S2 summarizing results scattered in the literature. The coalescence of H3K9me3-rich regions superposes well with areas intensely colorable with DAPI and identified as chromocenters. HP1 $\alpha$  and SUV39H1 are enriched in these regions but the density of acetylated H3K9ac is reduced (Fig.S1A). The catalytic activity of SUV39H1 is not necessary for this enrichment, suggesting that this is a re-binding phenomenon (Fig.S1B). The JMJD2B demethylase is not specifically enriched in the chromocenters. Only when catalytically active, JMJD2B prevents the enrichment of SUV39H1 in chromocenters (Fig.S2).

## References

- [1] G. Flouriot, G. Huet, F. Demay, F. Pakdel, N. Boujrad, D. Michel, The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications, *Biochem. J.* 461 (2014) 257-268.
- [2] M.K. Schuhmacher, S. Kudithipudi, D. Kusevic, S. Weirich, A. Jeltsch, Activity and specificity of the human SUV39H2 protein lysine methyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta.* 1849 (2015) 55-63.
- [3] L. Hillringhaus, W.W. Yue, N.R. Rose, S.S. Ng, C. Gileadi, C. Loenarz, S.H. Bello, J.E. Bray, C.J. Schofield, U. Oppermann, Structural and evolutionary basis for the dual substrate selectivity of human KDM4 histone demethylase family, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 41616-41625.
- [4] S. Krishnan, R.C. Trievel, Structural and functional analysis of JMJD2D reveals molecular basis for site-specific demethylation among JMJD2 demethylases, *Structure* 21 (2013) 98-108.
- [5] K. Müller-Ott, F. Erdel, A. Matveeva, J.P. Mallm, A. Rademacher, M. Hahn, C. Bauer, Q. Zhang, S. Kaltofen, G. Schotta, T. Höfer, K. Rippe, Specificity, propagation, and memory of pericentric heterochromatin, *Mol. Syst. Biol.* 10 (2014) 746.
- [6] L. Bosch-Presegué, H. Raurell-Vila, A. Marazuela-Duque, N. Kane-Goldsmith, A. Valle, J. Oliver, L. Serrano, A. Vaquero, Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection, *Mol. Cell* 42 (2011) 210-223.
- [7] F.A. Mallette, F. Mattioli, G. Cui, L.C. Young, M.J. Hendzel, G. Mer, T.K. Sixma, S. Richarda, RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites, *EMBO J.* 31 (2012) 1865-1878.
- [8] B.D. Fodor, S. Kubicek, M. Yonezawa, R.J. O'Sullivan, R. Sengupta, L. Perez-Burgos, S. Opravil, K. Mechtler, G. Schotta, T. Jenuwein, Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells, *Genes Dev.* 20 (2006) 1557-1562.
- [9] M.-K. Marcus Ta, H.-J. Lim, J.W. Harper, SCF<sup>F<sub>BOX</sub>22</sup> regulates histone H3 lysine 9 and 36 methylation levels by targeting histone demethylase KDM4A for ubiquitin-mediated proteasomal degradation, *Mol. Cell. Biol.* 31 (2011) 3687-3699.
- [10] C. Van Rechem, J.C. Black, P. Greninger, Y. Zhao, C. Donado, P.d. Burrows, B. Ladd, D.C. Christiani, C.H. Benes, J.R. Whetstine, A coding single nucleotide polymorphism in lysine demethylase KDM4A increases sensitivity to mTOR inhibitors, *Cancer Discov.* 5 (2015) 245-254.
- [11] I. Ipenberg, N. Guttmann-Raviv, H.P. Khoury, I. Kupershmit, N. Ayoub, Heat Shock Protein 90 (Hsp90) selectively regulates the stability of KDM4B/JMJD2B histone demethylase, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 14681-14687.



**Figure S1.** (A) Spatial segregation of trimethylated and acetylated H3K9me3. H3K9me3 is clearly enriched in the chromocenters which are intensely stained with DAPI, while conversely, acetylated H3K9 appears excluded from these areas. (B) Localization of GFP-tagged constructs relatively to H3K9me3. HP1 $\alpha$ , wild type SUV39H1 and the catalytically inactive mutant (H324L) of SUV39H1 are similarly enriched in H3K9me3-dense regions. H3K9me3 labeling is strikingly intensified in cell transfected with wt SUV39H1 compared to surrounding non-transfected cells and to the cells transfected with the catalytic mutant of SUV39H1. Note that overexpression of JMJD2B, but not of its catalytically inactive mutant (H188A), tends to soften the H3K9me3 dots.



**Figure S2.** Altered spatial distribution of FLAG-SUV39H1 in cells co-transfected with a catalytically active version of JMJD2B-GFP. The strong accumulation of exogenous FLAG-SUV39H1 in chromocenters is impeded by the catalytically active JMJD2B-GFP but is not pertubated by its catalytic mutant.

## ARTICLE N°4

Charly Jehanno, Gilles Flouriot, Floriane Nicol-Benoît, Yann Le Page, Pascale Le Goff and Denis Michel (2016)

Envisioning metastasis as a transdifferentiation phenomenon clarifies discordant results on cancer. *Breast Dis.* 36, 47-59.

Un des messages principaux de cet essai est que la recherche de « gènes métastatiques » est une impasse, car les métastases ne font qu'emprunter des programmes génétiques normaux, en accord avec la conclusion de Bert Vogelstein, grand spécialiste des mutations du cancer, qu'aucune mutation « driver » de métastases n'a pu être identifiée à ce jour. La cancérisation serait donc principalement une perte d'état cellulaire différencié primaire. C'est précisément l'objet de ce second article.





# Envisioning metastasis as a transdifferentiation phenomenon clarifies discordant results on cancer

Charly Jehanno, Gilles Flouriot, Floriane Nicol-Benoît,  
Yann Le Page, Pascale Le Goff and Denis Michel\*

*Université de Rennes1. Transcription Environnement et Cancer INSERM U1085 IRSET. Campus de Beaulieu Bat.13.  
35042 Rennes cedex France*

**Abstract** Cancer is generally conceived as a dedifferentiation process in which quiescent post-mitotic differentiated cells acquire stem-like properties and the capacity to proliferate. This view holds for the initial stages of carcinogenesis but is more questionable for advanced stages when the cells can transdifferentiate into the contractile phenotype associated to migration and metastasis. Singularly from this perspective, the hallmark of the most aggressive cancers would correspond to a genuine differentiation status, even if it is different from the original one. This seeming paradox could help reconciling discrepancies in the literature about the pro- or anti-tumoral functions of candidate molecules involved in cancer and whose actual effects depend on the tumoral grade. These ambiguities which are likely to concern a myriad of molecules and pathways, are illustrated here with the selected examples of chromatin epigenetics and myocardin-related transcription factors, using the human MCF10A and MCF7 breast cancer cells. Self-renewing stem like cells are characterized by a loose chromatin with low levels of the H3K9 trimethylation, but high levels of this mark can also appear in cancer cells acquiring a contractile-type differentiation state associated to metastasis. Similarly, the myocardin-related transcription factor MRTF-A is involved in metastasis and epithelial-mesenchymal transition, whereas this factor is naturally enriched in the quiescent cells which are precisely the most resistant to cancer : cardiomyocytes. These seeming paradoxes reflect the bistable epigenetic landscape of cancer in which dedifferentiated self-renewing and differentiated migrating states are incompatible at the single cell level, though coexisting at the population level.

**Keywords** breast cancer ; metastasis ; transdifferentiation ; epithelial-mesenchymal transition ; epigenetic landscape.

## INTRODUCTION

The multifaceted characteristics of cancer have historically been classified into two main classes of activities : immortalization and transformation [12], which can be induced by the same or separate cooperating oncogenes [51]. Immortalization is defined by the capacity of cells to divide in a deregulated manner, sustained by self-mitogenic stimulation. By itself, immortalization alone is rarely fatal since it leads to verrucas or at worst to well delimited primary tumors whose surgical treatment is relatively simple. By contrast, transformation is associated to aggressive metastatic tumors with poor prognosis and covers a wide range of cellular activities such as migration, disruption of the extracellular matrix and chemotaxis. The cellular programs of division and migration are different and incompatible in single cells [5], which implies that they are logically associated with different epigenetic marks and different sets of genetic circuits in

which given gene products can play either positive or negative roles in cancer.

## TRANSFORMATION RELIES ON NORMAL CELLULAR PROCESSES

In post-mitotic tissues, cellular immortalization generally results from cellular disorders, often resulting from mutations. By contrast, metastasis borrows non-altered cellular programs. Very interestingly, despite the dramatic importance of metastasis in cancer malignancy, metastasis has not been causally associated yet to any genetic alteration [67] and could rely on non-genetic dynamic epigenetics [21]. All the identified cancer-driver mutations, not merely age-dependent and passenger only [64], belong to pathways involved in cellular immortalization, but not in metastasis [67]. The interpretation of these

\*denis.michel@live.fr

authors is that metastasis could not result from genetic defects, but from normal programs hijacked by cancer cells. Accordingly, all the facets of metastasis can be carried out by completely normal cells without need for oncogenes. As a matter of fact, the experimental displacement of normal cells in ectopic locations is sufficient to induce similar changes [53]. Moreover, the migratory phenotype of aggressive metastatic cells evokes a particular type of differentiation, closely related to that of contractile cells. This view is strikingly supported by the involvement in cancer of factors identified in normal muscle differentiation, exemplified by myocardin-related factors. These factors are also at work in the complex phenomenon of epithelial-mesenchymal transition (EMT, where the T is sometimes used for Trans-differentiation, in agreement with the present proposal) [36] [56]. EMT recapitulates metastatic processes [24] including migration, cellular individualization and selfish behaviours, with loss of the initial differentiation markers and a metabolic switch to predominant glycolysis, similar to that of pluripotent stem cells [65]. Although EMT is often presented in the literature as a primary target for fighting cancer, it is also a normal cellular activity during development and healing [15] [54]. It is by essence reversible in these situations and also during cancer evolution. Once they reached metastasis-housing tissues, invading cells can initiate the reverse process of mesenchymal-epithelial transition (MET) and recover an epithelial-like state [24], so that fighting specifically EMT could have unwanted consequences and no effect on implanted secondary tumors [46]. Different categories of EMT have been defined, either normal, as in development and wound healing, or pathological in cancer [24] [78], but they are in fact likely to share identical genetic programs [78]) among which it is illusory to find cancer-specific defects. The propensity of the scientific community to separate and classify cellular phenomena can occult the generality of certain circuits. For example the different terms EMT, fibroblasts to myofibroblasts conversion, myoepithelial cell differentiation, endothelial to mesenchymal transition and metastasis etc. are processes involving common aspects [78], even if they are variable in their details [75]. The conception of metastasis as the result of normal genetic programs leads to counterintuitive conclusions : (i) The most deleterious aspect of cancer progression, corresponds paradoxically to a differentiation process. (ii) Metastatic phenotypes involve genes otherwise associated to normal differentiation, classically assumed to prevent cancer. This situation could be responsible for misunderstandings about the pro- or anti-cancer role of many genes, because the same cellular sub-programs can have opposite issues depending on the context and the balance between proliferation and migration indexes of the tumor. The example of such ambiguous pathway selected here is that of myocardin-related transcription factors MRTFs, which has been associated

with both metastasis in cancer and differentiation in muscular tissues which are, ironically, the most refractory to cancer. Ambiguous results have also been reported in the field of chromatin epigenetics.

## CONTRADICTORY REPORTS ON CANCER EPIGENETICS

Conflicting proposals coexist in the literature about cancer chromatin epigenetics. Cancer cells generally lose differentiation marks of their original tissue and acquire stem-like features including proliferation and open chromatin. But at the opposite, repressive chromatin characteristic of differentiated cells, has also been considered as a hallmark of cancer [62]. These controversies mirror those existing about the impact on cancer of the enzyme responsible for the formation of the H3K9me3 histone mark : SUV39H1. SUV39H1 is sometimes considered as a therapeutic target [4] [76], and inversely as a cancer-preventing molecule whose downregulation has a strong tumorigenic potential [26]. These discrepancies can be clarified by considering the ambiguous nature of cancer. Normal cell differentiation is associated with a profound reorganization of chromatin, including an increase of repressive marks (H3K9me3 and H3K37me3) [13]. By contrast, diffuse facultative heterochromatin and genome-wide gene expression characterize stem cells [37] [7] [29]. This property has long been exploited as a technical opportunity in mouse genome engineering, for allowing the selection of embryonic stem (ES) cells expressing antibiotic resistance cassettes inserted in virtually any gene. The background of generalized gene expression in stem cells [7] explains the necessity to demethylate H3K9me3 to maintain the self-renewal of embryonic stem cells [31]. Similar observations have been reported for cancer cells which lose de-differentiation markers and acquire globally open chromatin, with prominent histone acetylation and lower H3K9me3 trimethylation [37]. Inversely, this chromatin mark has been shown responsible for the difficulty to reprogram differentiated nuclei in nuclear transfer experiments [33] [1]. The massive loss of heterochromatin in cancer is also reflected by the decondensation of Barr bodies (X inactivated) observed in many breast and ovarian cancers [50].

In the globally loose chromatin of undifferentiated or de-differentiated states, beside constitutive heterochromatin, H3K9me3 could be confined to few genetic loci, corresponding notably to tumour-suppressor genes. But in migratory cells, this mark could be more abundant and reflect the innermost nature of contractility as part of a differentiation program. This difference could explain the conflicting conclusions found about the role of SUV39H1 in cancer depending on the tumours considered, either positive [26] or negative [76]. The same reasoning applies to many genetic pathways, including that of myocardin-

related transcription factors.

## THE YIN AND YANG OF MYOCARDIN-RELATED TRANSCRIPTION

Among the lot of molecules already incriminated in EMT and tumor transformation, attention will be focused here on myocardin-related transcription factors (MRTFs), because they are representative of genes with bivalent roles in cancer. The switch of tumoral cells from proliferative to migratory behaviours involves MRTFs, linking the cytoskeleton to gene expression. But somewhat paradoxically, MRTFs are also the markers of a particular differentiation state, precisely the most refractory to cancer, cardiomyocytes.

### Cardiac departments are missing in cancer institutes

The Holy Grail of the anti-cancer recipe has been sought by researchers in exotic organisms resistant to cancer; but it is in fact not necessary to look as far, as the anti-cancer secret seems to be detained by one of our own organs: the heart. Heart is resistant to cancer despite its relatively high number of cells (300-400g), compared for example to pancreas (70-100g), that is highly subject to cancer. The rare tumours found in the heart are either of exogenous origin or derive from the connective tissue (myxomas), but never from cardiomyocytes. To understand this strange cellular specificity, one is tempted to look for genes specifically expressed in these cells and preventing their tumorigenesis. This inquiry readily leads to transcription factors specialised in the synthesis of contractile machineries, including myocardin, specific of cardiomyocytes and smooth muscle cells (SMC) [68][70] [32] [19][35] and myocardin-related factors, constitutively nuclear and strongly enriched in these cells, but sometimes expressed at lower levels in other cell types where they are subject to nucleocytoplasmic shuttling. The experimental disruption of myocardin leads to the de-differentiation and malignant transformation of smooth muscular cells [38] and conversely, myocardin is an ingredient of a cocktail of factors capable of reprogramming cells towards a cardiac fate [43]. These observations are in radical contrast with the activities of MRTFs reported in cancer.

### Common modes of action but opposite effects of myocardin-related transcription factors in cancer and myocytes

Cardiomyocytes and SMCs overexpress actin isoforms and actin-related genes which are governed by serum-responsive elements (SRE), originally identified in the

promoter of the immediate early gene *c-fos* and then extended to muscle-specific elements (named CArG). The selection of the subsets of SRE-dependent genes related to either division or motility, is partly dictated by the competing association with a common surface of SRF [77], with different coactivators [59], namely TCF for division and MRTFs for cytoskeletal dynamics [71] [8]. The result of this competition depends on the mode of cellular adhesion [72]. In contractile cells, the poorly efficient SRF transcription factor is strengthened by fixation of MRTFs which work as coactivators because they are endowed with potent transcription activation domains while devoid of an own DNA-binding domain. Some members of the partially redundant MRTF family are specific of cardiomyocytes, such as its founder member Myocardin [68]. Other ones such as MRTF-A/MKL1 are abundant in muscle cells [69] [58], but are also found at lower levels in other cell types. MRTFs are constitutively nuclear and active in muscular cells, whereas their nuclear translocation and activity are controlled by stimuli in other cell types [49]. Heart-specific myocardin is not regulatable by actin-mediated nuclear shuttling in spite of the presence of RPEL motifs in its amino-acid sequence [11]. At first glance, the roles of MRTFs appear strikingly different in the different cell types. In epithelial cells, MRTF-A seems to be involved in EMT and cancer progression [56] [30] and consistently a factor inhibiting the transcriptional activity of MRTF-A, SCAI, is a suppressor of cancer [2], whereas in SMCs, MRTFs are clearly involved in differentiation [32]. The main interpretation suggested here to reconcile these opposite effects is that these factors are basically involved in the synthesis of actin-related contractile machineries (actin isoforms, myosin light chains, gelsolin, FHL2, etc.). These machineries participate to some extent to the mechanical phases of mitosis, but they are necessary in much larger amounts for the contractile processes of migration and thereby metastasis. Conversely, in the context of differentiated SMC and cardiomyocytes, these molecules participate to a normal differentiation program reinforcing a differentiated state.

## SUPPORTING OBSERVATIONS WITH BREAST CANCER CELLS

The theoretical considerations proposed above can be illustrated with original observations obtained with the widely used human Michigan Cancer Foundation (MCF) breast cancer cell lines, which are poorly aggressive and fail to give tumors in nude mice. Consistent results are obtained using estrogen receptor-negative MCF10A cells and estrogen receptor-positive MCF7 cells. These two cell lines are immortalized but retain certain epithelial markers. This situation facilitates in practice the visualization of a transdifferentiation into a contractile phenotype.

## MCF10A cells expressing or not the transforming oncogene src

The MCF10A-Er-Src cell line has been engineered from the parental MCF10A cell line to contain an inducible viral oncogene v-src oncogene [23]. This potent oncogene found in the Rous-sarcoma virus has the well-established capacity to transform the cell through deregulated phosphorylation of many target proteins from the cytoskeleton such as vinculin [16]. Upon addition of the inducer of the ER-src construct (the ER ligand 4OHT), certain cells switch from an epithelial-like to individualized and stellate morphology. This transition is accompanied by series of changes. As shown in Fig.1, the epithelioid shapes are disrupted and the cells appear more individualized, with a disorganization and a dramatic drop of the expression of E-cadherin and an apparent shrinking of nuclei (top of panel A). This transformation is associated with a profound reorganization of actin with an increase of filamentous actin (Fig.1A bottom), and a significant increase of the mark H3K9me3 (Fig.1C). The transcriptional coactivator MRTF-A involved in the expression of actin and contractile machineries also increased globally, with a tendency of nuclear enrichment in certain dish areas where the cells present the most altered morphology (Panel D). Interestingly, these effects are to some extent recovered without induction of ER-src, by merely adjusting the density culture (panel E), consistent with the established influence of cell-cell contacts on SRF/MRTF signalling [3]. This effect of density, in conjunction with serum, has been examined in another widely used cellular tool for studying breast cancer, MCF7 cells.

## MCF7 cells

When cultured at confluence, MCF7 mammary cells retain a relatively differentiated epithelial phenotype, which can be disrupted at low density. In our experimental conditions with epithelial cells, the proportion of proliferating and migrating cells can be adjusted experimentally in non-confluent cell cultures (Fig2A). Serum is a crude mixture containing some nutrients and, in variable amounts depending on the batches, factors capable of inducing proliferation (such as EGF) and cytoskeletal dynamics (such as TGF $\beta$ ). As a consequence, its global effect is complex and should be redefined for every cell type. The drastic effect of serum addition on nuclear translocation is well established in fibroblastic cells [39], but less spectacular in epithelial cells. We first examined the behaviour of MCF7 cells with low or high serum in cell spreading assays after release from confluence (Ibidi<sup>®</sup> chambers). The cells initially densely packed are suddenly allowed to evade a dense area and different markers are examined in the spreading area (Fig.2B). Low serum promotes cell spreading and migration, with a marked decrease of the fraction of cells

with a strong nuclear staining of PCNA. In contrast, in presence of high serum, the cells actively proliferate and colonize free areas by increase of cell number instead of net moving. Interestingly, nuclear ER $\alpha$  staining decreased in all conditions in peripheral cells, proliferating as well as migrating (not shown), which indicates that in both cases, they lost their original epithelial differentiation state. Strikingly, the nuclear enrichment of MRTF-A was observed only in migrating cells whereas it remains predominantly cytoplasmic in proliferating cells. This result agrees with the admitted mode of nuclear translocation of MRTF-A, anchored in the cytoplasm by globular non-polymerized actin and released in the nucleus following actin polymerization [41]. In parallel, dramatic changes are observed at the chromatin level. Migrating cells with nuclear MRTF-A were strongly enriched in trimethylated H3K9 whereas acetylated H3K9 strongly increased in proliferative cells. Though simple, this experiment is illuminating with respect to the dual behaviour of cancer cells. H3K9 trimethylation only reflects the differentiation-like nature of migration but is not a primary marker of cancer since it is not increased in proliferative cells. Conversely, H3K9 hyperacetylation and PCNA accumulation are observed only in proliferating cells in which MRTF-A is less enriched in the nucleus. The nuclear enrichment of MRTF-A in presence of low serum is confirmed in homogeneous culture conditions at low density (Fig.3A). This result seems discordant with the initial reports on nuclear translocation of MRTF-A [39]. We verified that the propensity of MRTF-A to translocate in the nucleus is much higher in highly aggressive cells in which MRTF-A is predominantly nuclear, such as the human breast cancer cells MDA, and the epithelioid Hela cells (data not shown). Hence, using the moderately transformed MCF7 cells, the combination of density and serum allows to separate proliferation and migration. Serum has been shown to induce both programs in NIH 3T3 cells [8], but it would be interesting to precise if they are indeed activated in the same individual cells. Our experiments suggest that these two programs coexist in the same population but are mutually exclusive at the level of individual cells. In our conditions, serum addition stimulates proliferation without triggering massive nuclear accumulation of MRTF-A in MCF7 cells and conversely, low serum favours the nuclear accumulation of MRTF-A.

The selective involvement of MRTF-A in the migratory phenotype can be further visualized by the co-detection of markers at the single cell level. The nuclear fraction of MRTF-A differs from one cell to another within the same cell culture, but the stronger enrichment of nuclear MRTF-A is systematically associated to the exclusion of traditional proliferation markers (Fig.3B) such as cyclin D1 (cells in G1 phase), proliferating cell nuclear antigen PCNA (cells in S phase) and, at the level of chromatin, acetylated lysine 9 and phosphorylated serine 10 (cells in

M phase) of histone H3. Conversely the cytosstatic cyclin dependent kinase inhibitor P27 (cells in G0 phase) is increased in MRTF-A positive cells. The transfected cells in which MRTF-A is strongly nuclear correspond precisely to those containing the higher total cellular content of this protein, suggesting the existence of a simultaneous control of MRTF-A translocation and stabilization. As shown in Fig.3C and quantified in Fig.3D, the loss of the proliferation marker PCNA is predominant in the cells which acquire the higher contractile phenotype depicted by the peripheral accumulation and organization of the focal adhesion protein FHL2.

To further assess the mutual exclusion between MRTF-A activity and proliferation, we took advantage of a MCF7 cell line described in [10]. This cell line contains a transgene encoding a mutant version of MRTF-A lacking its N-terminal domain called RPEL and responsible for the cytoplasmic anchoring of MRTF-A with globular actin. This mutant version is constitutively active (CA) and nuclear, capable of binding to SRF and activating the expression of SRF-MRTF-A-activated genes. As shown in Fig.3, the cell cycle is clearly downregulated in these cells as revealed by the traditional proliferation markers Ki-67 at the protein as well as mRNA level. Conversely the mRNA of the cell cycle arrest marker P21 was upregulated (not shown). We conclude that the proliferation of MCF7 cells is stimulated by mitogenic factors of serum and conversely migration is favoured in presence of low serum. The cell cycle is inhibited in the cells where MRTF-A/SRF is most strongly activated (Fig. 3B), consistent with the cytosstatic effect of MRTF-A reported in certain cells [74].

## REVISION OF THE CANCER EPIGENETIC LANDSCAPE

The transdifferentiation hypothesis described here is expected to correspond to two attractors in a dynamic epigenetic landscape, popularized as the Waddington landscape [61] [22] [45]. A simplified such landscape is proposed in Fig.4 to illustrate the situation. In this scheme, two juxtaposed attractors correspond to proliferative and myocytic cells. Compared to the initial differentiated state, cancer cells have the higher potential in this landscape, contrary to that proposed in [62] in which the cells with high H3K9me3 have the less determined epigenetic status. On reflection, it seems logical that self-renewing cells with a less condensed chromatin, are the most pluripotent. In self-renewing pluripotent cells, the selective closure of incompatible genetic circuits did not yet occur, so that these cells retain many possible differentiation fates [44]. Globally more accessible chromatin is also consistent with the intense gene expression necessary for synthesizing the components of new cells.

## Attractor switching

Some cells can occasionally leave this intensely biosynthetic stem-like state and commit to differentiate in various cell types which can then be selected by environmental conditions. In particular, a myocytic-like phenotype could underlie metastasis, providing selectable advantages to the cancer cell population. Although migration and proliferation are mutually incompatible at a given moment for a given cell, they coexist in different cells cultured in the same conditions and also in endogenous tumors. They can also coexist in the same cell, but at different times, because migration alone is likely to be not sustainable for individual cells if not periodically interrupted by phases of cellular division. These phases may alternate with a reorganization of chromatin, consistent with the plasticity and reversibility of H3K9me3 heterochromatin [14]. In this picture, chromatin changes are expected to mainly rely on dynamic protein modifications but to be not further locked by DNA methylation, in agreement with the absence of DNA methylation measured during EMT [34], thereby facilitating bidirectional switches between the two cancer attractors drawn in Fig.3. By nature, Waddington epigenetics is reversible, so that individual cells in the tumoral population can occasionally switch from an attractor to another one, which could contribute to the phenotypic heterogeneity observed in tumors and in cell cultures. The conversions between these attractors could be stochastic or deterministic. Deterministic parameters cover a wide variety of chemical and physical microenvironmental conditions such as the number of neighbouring cells, concentration gradients of extracellular ligands or serum composition and concentration. The transitions can also result from negative feedback-driven oscillations or simply be stochastic, that is to say apparently random and underlain by hidden microscopic causes. The fundamental reversibility of Waddington epigenetics suggests that in theory, the stem-like cells of Fig.4 could re-differentiate into epithelial cells or virtually any other cell type. This possibility seems to be not forbidden, as suggested by certain experiments of reprogramming of nuclei from malignant cells [18], but it is however likely to be prevented in most cases by no-return mutations with a ratchet effect, or mutations distorting the epigenetic landscapes [20].

The proliferative and migrating states are mutually exclusive but are expected to be close together [5]. The proximity of proliferation and migration is suggested by the dual involvement of SRF in the transcription of mitotic and contractile gene repertoires [8] and to some extent, by the involvement of MRTF-A in proliferation. At the cell population level, the src oncogene as well as serum can increase both the mitotic index and actin cytoskeletal structures, suggesting that they can induce the two facets of cancer (Fig.4), which generally coexist in the cell population, in variable extents depending on the cancer grade. These two aspects are also gathered toge-

ther in EMT, showing that EMT corresponds more to a dual cellular competence than to an integral cellular activity strictly speaking. In a single cell, only one of these programs can be activated at a time, as suggested but the exclusion of proliferative markers in the cells in which MRTF-A the most strongly activated (Fig.3B).

### Attractor disjoining and stability

The plasticity of EMT does not forbid the clear separation of the attractors which are individualized by specific self-stabilizing biochemical circuits [44]. The proliferative state is relatively stable as it corresponds to an archaic attractor reminiscent of unicellular organisms and maintained in stem cells present in most tissues [25] [21]. The contractile phenotype is also strengthened by many stabilizing positive feedbacks. On the one hand, MRTF-A activities are controlled by actin dynamics and on the other hand, actin genes are key transcriptional targets of MRTF-A, in a typical feedback [55] that can enforce the migratory phenotype in cancer cells. Another example of self-sustained loop stabilizing the migratory phenotype involves the adaptor protein FHL2, closely associated to metastasis [66]. FHL2 is strongly upregulated at the transcriptional level by MRTF-A ([57] and Fig.3), and in turn, MRTF-A is strongly stabilized by FHL2 [17].

## CONCLUSION

There are many paradoxes in the current literature on cancer, particularly regarding (i) its epigenetic marks, or (ii) the impact of many genes on cancer evolution. Several molecules are perceived as either favouring or preventing cancer depending on the laboratories. A celebrated example is the TGF $\beta$  pathway considered as a safeguard signal for quiescent differentiated cells through its anti-mitotic action, but which becomes a deleterious signal aggravating the metastatic phenotype [63]. The same duality is recovered for intracellular mediators of TGF $\beta$  signalling such as Smad3, capable of either preventing [28] or aggravating tumoral evolution [73]. Similarly, how to explain that myocardin-related factors are associated to the differentiation of cancer-resistant cardiomyocytes and SMCs, or cell cycle arrest during the differentiation of podocytes [74], whereas they are involved in EMT and tumor transformation [56]. In the same manner, why SUV39H1 is considered depending on the authors as either a pro-tumoral [4] or anti-tumoral [6] [26] enzyme. The view of cancer as a trans-differentiation phenomenon can shed light on this virtually endless list of discrepancies. Their commonplace justification in the literature is that they could result from unknown cellular contexts and the use of different cell lines. Indeed, a major lesson of dynamic epigenetics symbolized by Waddington landscapes, is that the precise function of every gene is specified by the collective adjustment of all gene

products in gene regulatory circuits. A stationary state in which all these levels of expression are mutually compatible is called an attractor and in theory, the precise function of every gene should be redefined in every attractor, as illustrated by the differential impact of TGF $\beta$  on the intact vs injured regions of the epithelium [60]. The harmful activity of TGF $\beta$  could selectively target the myocytic-like attractor, in a MRTF-A dependent manner [40][47][48]. As a matter of fact, Smad3 and MRTF collaborate to induce the repressor of the epithelial differentiation state Snail2 [40]. The role of TGF $\beta$  on the change of cellular adhesion and shape associated to EMT involves MRTF-A signaling [47] and conversely, the response to TGF $\beta$  depends on cellular density [42].

There is a generalized connection, more or less distant, between all the genetic circuits in a global Waddington epigenetic landscape. In particular, the two facets selected here, chromatin epigenetics and MRTF-A signaling, are related because MRTF-A can profoundly alter the degree of chromatin compaction and modifications [10] and it has recently been shown to mediate the formation of permissive chromatin with trimethylated H3K4 at the levels of TGF $\beta$ -responsive genes [9]. In the mixed view of cancer presented here, the cellular population distributes over two attractors which are both close together and distinct : an undifferentiated one characterized by low H3K9me3 chromatin and a more differentiated one enriched in H3K9me3 marks, in which contractile functions are activated. In fact, metastatic cells undergoing migration are quiescent, in line with the cytostatic effect of MRTF-A [27] and the low level of PCNA measured in migratory cells (Figs.2A and 3C). But in cancer cells, contrary to cardiomyocytes, this state is not a primary differentiation process but is necessarily subsequent to the previous dedifferentiation of the original differentiation state, epithelial in the example described here. This double jump is typically a transdifferentiation phenomenon. The present hypothesis is aimed at solving inconsistencies in the literature on cancer, but unfortunately does not really simplify the therapeutic approaches. For example, fighting specifically proliferation through depriving cancer cells from nutrients could have deleterious long term effects by selecting the opportunistic nomadic consumption strategy of migratory cells.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell lines and treatments

MCF7 were routinely cultured in DMEM (Dulbecco' Modified Eagle' Medium, Invitrogen) supplemented with 10% FBS (biowest) and antibiotics (Invitrogen) at 37C in 5% CO2. MCF7 cells stably expressing MKL1 or MKL1- $\Delta$ N200 constructs were established using the T-Rex subclones system [10]. Expression of the proteins of interest was induced by a 48 h treatment of the MCF7 sub-

clones with tetracyclin, in DMEM supplemented with 2% charcoal-stripped of fetal calf serum (FCS). Migration assays were carried out in IBIDI chambers (Ramcon). MCF7 cells were seeded at confluence in DMEM supplemented with 2% or 10% of FCS into chambers fixed with collagenase to the lamella. After 48h, cells were released by gently removing the chambers for 15h. MCF10A stably expressing the ER-Src construct were kindly provided by Dr Kevin Struhl from Harvard Medical School, and were maintained in DMEM supplemented 5% of charcoal stripped horse serum (Invitrogen), with 20 ng/ml of EGF, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 100 ng/ml of cholera toxin (Sigma-Aldrich) and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of insulin (Sigma-Aldrich). When indicated, MCF10A ER-Src cells were treated with 1  $\mu\text{M}$  of 4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich).

## RNA extraction and qPCR

Total RNA extractions were performed using RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Retrotranscription was performed on 1  $\mu\text{g}$  of RNA with random primers using MMLV reverse transcriptase. Quantitative RTPCRs were performed using the iQ<sup>TM</sup> SYBR Green supermix from BioRad (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The primer sequences used for qPCR are ki67 forward 5'-ATAAACACCCCAACACACACAA-3' and reverse 5'-GCCACTTCTTCATCCAGTTAC- 3'; fhl2 forward 5'-GGCAAGAAGTACATCCTGCG-3' and reverse 5'- CCACCAGTGAGTTTCTGCAC-3'.

## Immunofluorescence and antibodies

Cells were grown on 10-mm-diameter coverslips in 24-well plates in the presence of DMEM containing 2% charcoal-stripped FCS. Cells were fixed with PBS/4% PFA (paraformaldehyde) for 10 min and then permeabilized in PBS/0.3 % Triton X-100 for 10 min. The antibodies used for immunofluorescence analyses were used at 1/1000 dilution and are indicated as follows : E-cadherin (ab15148; Abcam), MKL1 (ab113264; Abcam), H3K9ac (histone H3 acetylated at Lys 9; ab10812; Abcam), H3K9me3 (histone H3 trimethylated at Lys 9; ab8898, Abcam), H3 (ab1791, Abcam) PCNA(Dako, M0879), FHL2 (PA5-28643, Thermo Scientific), P27 (sc528, Santa Cruz), Cyclin D1 (Santa Cruz) H3pSer10 (Serine 10 Phosphorylated Histone H3, sc8656-K Santa Cruz) and FLAG (M2, Sigma-Aldrich). Images were quantified using ImageJ software.

## Quantification

Immunostaining signals were quantified from fluorescence microscopy images by averaging the intensity of the same area of 50 arbitrarily chosen cells or nuclei

obtained from three independent experiments. Stars on histograms correspond to Mann-Whitney U tests . RT-PCR values are expressed as the mean of fold induction compared to controls of four independent experiments ; \*P<0.05 with the Mann-Whitney U test.

**Acknowledgements.** This work is supported by the Ligue inter-régionale de lutte contre le cancer des Côtes d'Armor et de l'Ille-et-Vilaine.

## Références

- [1] J. Antony, F. Oback, L.W. Chamley, B. Oback and G. Laible, Transient JMJD2B-mediated reduction of H3K9me3 levels improves reprogramming of embryonic stem cells into cloned embryos, *Mol. Cell. Biol.* **33** (2013), 974-983
- [2] D.T. Brandt, C. Baarlink, T.M. Kitzing, F. Kremmer, J. Ivaska, P. Nollau and R. Grosse, SCAI acts as a suppressor of cancer cell invasion through the transcriptional control of beta1-integrin, *Nat Cell Biol.* **11** (2009) 557-568.
- [3] S. Busche, A. Descot, S. Julien, H. Genth and G. Posern, 2008/ Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling, *J. Cell. Sci.* **121** (2008) 1025-1035
- [4] T. Chiba, T.Saito, K. Yuki, Y. Zen, S. Koide, N. Kanogawa, T. Motoyama, S. Ogasawara, E. Suzuki, Y. Ooka, A. Tawada, M. Otsuka, M. Miyazaki, A. Iwama and O. Yokosuka 2014. Histone lysine methyltransferase SUV39H1 is a potent target for epigenetic therapy of hepatocellular carcinoma, *Int. J. Cancer* **136** (2014) 289-298.
- [5] A. De Donatis, F. Ranaldi, P. Cirri, Reciprocal control of cell proliferation and migration, *Cell. Commun. Signal.* **8** (2010) 20.
- [6] C. Dong, Y. Wu, Y. Wang, C. Wang, T. Kang, P.G. Rychahou, Y.I. Chi, B.M. Evers and B.P. Zhou BP, Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer, *Oncogene* **32** (2013) 1351-1362.
- [7] S. Efroni, R. Duttagupta, J. Cheng, H. Dehghani, D.J. Hoepfner, C. Dash, D.P. Bazett-Jones, S. Le Grice, R.D. McKay, K.H. Buetow, T.R. Gingeras, T. Misteli, E. Meshorer, Global transcription in pluripotent embryonic stem cells, *Cell Stem Cell.* **2** (2008) 437-447
- [8] C. Esnault, A. Stewart, F. Gualdrini, P. East, S. Horswell, N. Matthews and R. Treisman, Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts, *Genes Dev.* **28** (2014) 943-958.
- [9] Z. Fan, C. Hao, M. Li, X. Dai, H. Qin, J. Li, H. Xu, X. Wu, L. Zhang, M. Fang, B. Zhou, W. Tian, Y. Xu, MKL1 is an epigenetic modulator of TGF- $\beta$  induced fibrogenesis, *Biochim. Biophys. Acta.* **1849** (2015) 1219-1228.
- [10] G. Flouriot, G. Huet, F. Demay, F. Pakdel, N. Boujrad and D. Michel, The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications, *Biochem. J.* **461** (2014) 257-268.

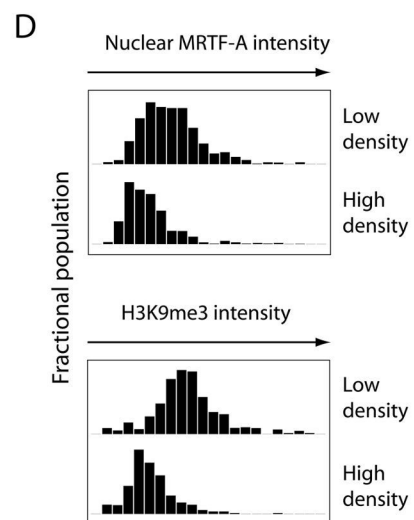
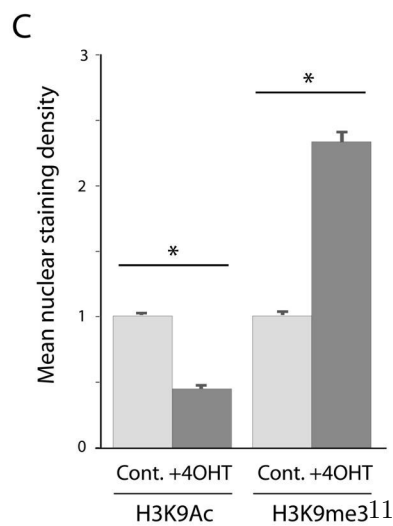
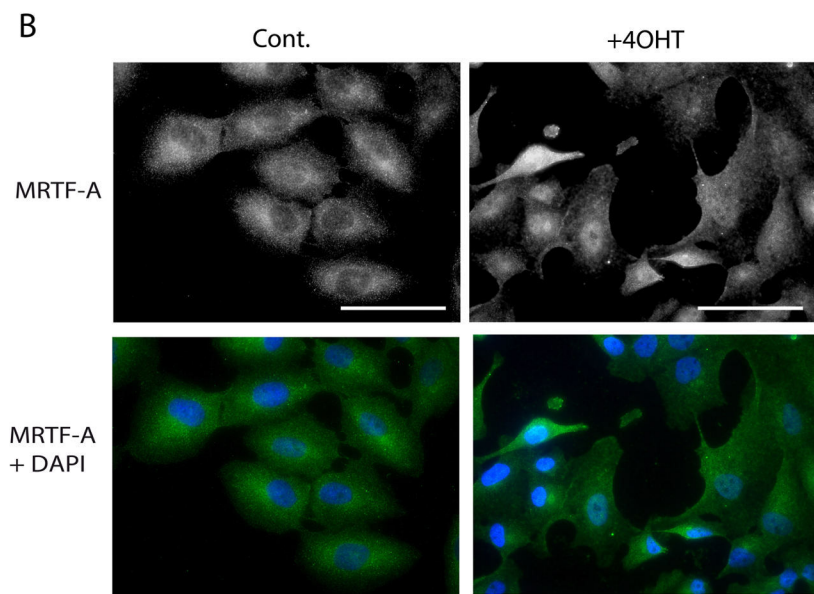
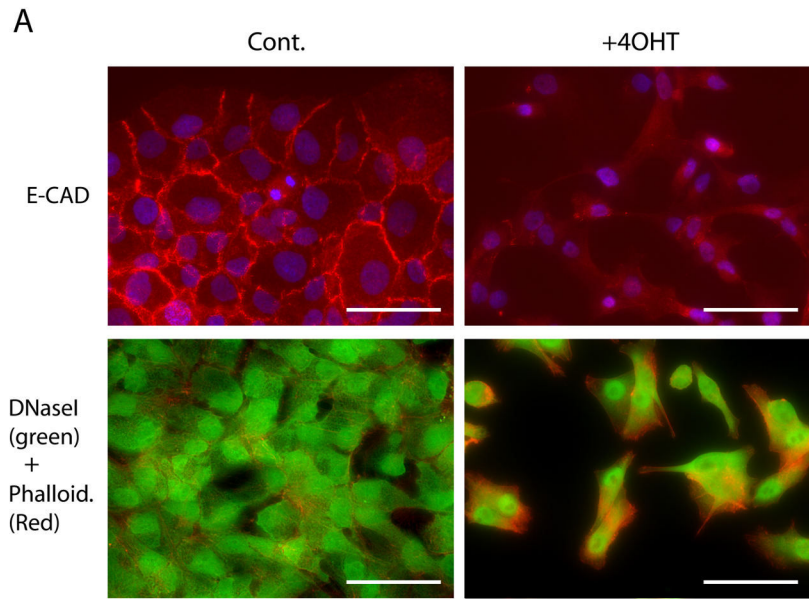


- [11] S. Guettler, M.K. Vartiainen, F. Miralles, B. Larijani, R. Treisman, RPEL motifs link the serum response factor co-factor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding, *Mol. Cell. Biol.* **28** (2008) 732-742.
- [12] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, *Cell* **100** (2000) 57-70.
- [13] R.D. Hawkins, G.C. Hon, L.K. Lee, Q. Ngo, R. Lister, M. Pelizzola, L.E. Edsall, S. Kuan, Y. Luu, S. Klugman, J. Antosiewicz-Bourget, Z. Ye, C. Espinoza, S. Agarwahl, L. Shen, V. Ruotti, W. Wang, R. Stewart, J.A. Thomson, J.R. Ecker and B. Ren, 2010. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell.* **6** (2010) 479-491.
- [14] N.A. Hathaway, O. Bell, C. Hodges, E.L. Miller, D.S. Neel and G.R. Crabtree, Dynamics and memory of heterochromatin in living cells, *Cell* **149** (2012) 1447-1460.
- [15] E.D. Hay, An overview of epithelio-mesenchymal transformation, *Acta Anat (Basel)*, **154** (1995) 8-20.
- [16] T. Hunter, Protein phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell* **22** (1980) 647-648.
- [17] J.S. Hinson, M.D. Medlin, J.M. Taylor and C.P. Mack, Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295** (2008) H1067-H1075.
- [18] K. Hochedlinger, R. Blueloch, C. Brennan, Y. Yamada, M. Kim, L. Chin and R. Jaenisch, Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev.* **18** (2004) 1875-1885.
- [19] J. Huang, M. Min Lu, L. Cheng, L.J. Yuan, X. Zhu, A.L. Stout, M. Chen, J. Li and M.S. Parmacek, Myocardin is required for cardiomyocyte survival and maintenance of heart function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (2009) 18734-18739.
- [20] S. Huang, D.E. Ingber, A non-genetic basis for cancer progression and metastasis : self-organizing attractors in cell regulatory networks, *Breast Disease* **26** (2006-2007) 27-54.
- [21] S. Huang, On the intrinsic inevitability of cancer : from foetal to fatal attraction, *Semin. Cancer Biol.* **21**(2011) 183-199.
- [22] S. Huang, The molecular and mathematical basis of Waddington's epigenetic landscape : a framework for post-Darwinian biology? *Bioessays* **34** (2012) 149-157.
- [23] D. Iliopoulos, H.A. Hirsch and K. Struhl, An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation, *Cell* **139** (2009) 693-706.
- [24] R. Kalluri and R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* **119** (2009) 1420-1428.
- [25] S.A. Kauffman, The origins of order : self-organization and selection in evolution, *Oxford University Press*. 1993.
- [26] P. Khanal, G. Kim, S.C. Lim, H.J. Yun, K.Y. Lee, H.K. Choi and H.S. Choi, Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates the stability of SUV39H1 to promote tumorigenesis in breast cancer, *FASEB J.* **27** (2013) 4606-4618.
- [27] Y. Kimura, T. Morita, K. Hayashi, T. Miki and K. Sobue, Myocardin functions as an effective inducer of growth arrest and differentiation in human uterine leiomyosarcoma cells, *Cancer Res.* **70** (2010) 501-511.
- [28] E.A. Kohn, Y.A. Yang, Z. Du, Y. Nagano, C.M. Van Schyndle, M.A. Herrmann, M. Heldman, J.Q. Chen, C.H. Stuelten, K.C. Flanders and L.M. Wakefield, Biological responses to TGF- $\beta$  in the mammary epithelium show a complex dependency on Smad3 gene dosage with important implications for tumor progression, *Mol. Cancer Res.* **10** (2012) 1389-1399.
- [29] D.C. Kraushaar and K. Zhao, The epigenomics of embryonic stem cell differentiation, *Int. J. Biol. Sci.* **9** (2013) 1134-1144.
- [30] L. Leitner, D. Shaposhnikov, A. Mengel, A. Descot, S. Julien, R. Hoffmann and G. Posern, MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins, *J. Cell. Sci.* **124** (2011) 4318-4331.
- [31] Y.H. Loh, W. Zhang, X. Chen, J. George and H.H. Ng, Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells, *Genes Dev.* **21** (2007) 2545-2557.
- [32] X. Long, R.D. Bell, W.T. Gerthoffer, B.V. Zlokovic and J.M. Miano, Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28** (2008) 1505-1510.
- [33] S. Matoba, Y. Liu, F. Lu, K.A. Iwabuchi, L. Shen, A. Inoue, Y. Zhang, Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation, *Cell* **159** (2014) 884-895
- [34] O.G. McDonald, H. Wu, W. Timp, A. Doi and A.P. Feinberg, Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18** (2011) 867-874.
- [35] C.P. Mack, Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31** (2011) 1495-1505
- [36] S. Medjkane, C. Perez-Sanchez, C. Gaggioli, E. Sahai and R. Treisman, Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis, *Nat. Cell. Biol.* **11** (2009) 257-268.
- [37] E. Meshorer and T. Misteli, Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7** (2006) 540-546.
- [38] M. Milyavsky, I. Shats, A. Cholostoy, R. Brosh, Y. Bugganim, L. Weisz, I. Kogan, M. Cohen, M. Shatz, S. Madar, E. Kalo, N. Goldfinger, J. Yuan, S. Ron, K. MacKenzie, A. Eden and V. Rotter, Inactivation of myocardin and p16 during malignant transformation contributes to a differentiation defect, *Cancer Cell* **11** (2007) 133-146.
- [39] F. Miralles, G. Posern, A.I. Zaromytidou and R. Treisman, Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL, *Cell* **113** (2003) 329-342.
- [40] T. Morita, T. Mayanagi and K. Sobu, Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J. Cell. Biol.* **179** (2007) 1027-1042.

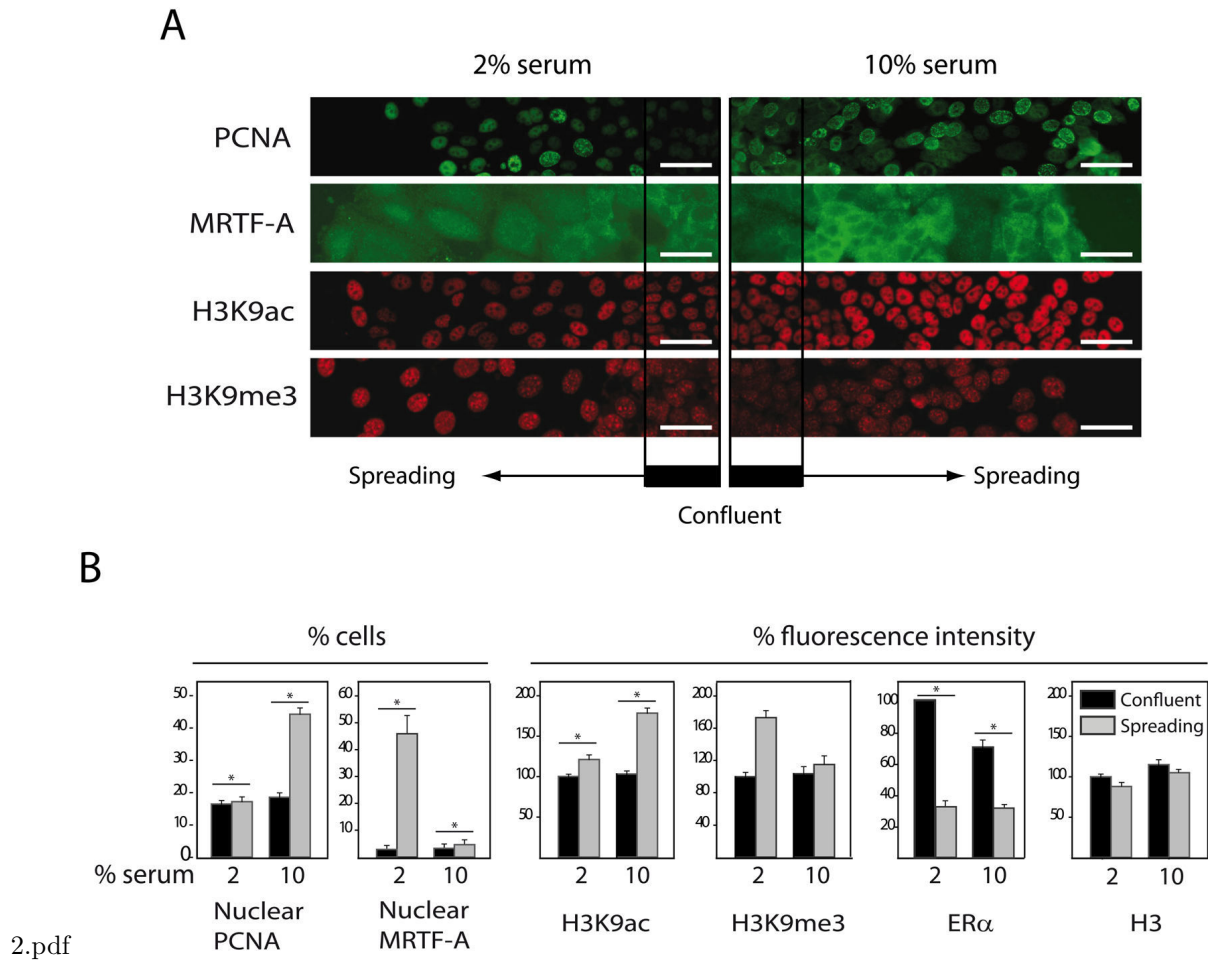
- [41] S. Mouilleron, C.A. Langer, S. Guettler, N.Q. McDonald and R. Treisman, Structure of a pentavalent G-actin\*MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator, *Sci. Signal.* **4** (2011) ra40
- [42] F. Nallet-Staub, X. Yin, C. Gilbert, V. Marsaud, S. Ben Mimoun, D. Javelaud, E.B. Leof, A. Mauviel, Cell density sensing alters TGF- $\beta$  signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation, *Dev. Cell.* **32** (2015) 640-651.
- [43] Y.J. Nam, K. Song, X. Luo, E. Daniel, K. Lambeth, K. West, J.A. Hill, J.M. DiMaio, L.A. Baker, R. Bassel-Duby, E.N. Olson, Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (2013) 5588-5593.
- [44] F. Nicol-Benoit, P. le Goff, Y. le Dréan, F. Demay, F. Pakdel, G. Flouriot and D. Michel, Epigenetic memories : structural marks or active circuits? *Cell. Mol. Life Sci.* **69** (2012) 2189-2203.
- [45] F. Nicol-Benoit, P. le Goff and D. Michel, Drawing a Waddington landscape to capture dynamic epigenetics, *Biol. Cell.* **105** (2013) 576-584.
- [46] M.A. Nieto, Epithelial plasticity : a common theme in embryonic and cancer cells, *Science* **342** (2013) 1234850.
- [47] J.W. O'Connor, E.W. Gomez, Cell adhesion and shape regulate TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-myofibroblast transition via MRF1-A signaling, *PLoS One* **8** (2013) e83188.
- [48] J.W. O'Connor, P.N. Riley, S.M. Nalluri, P.K. Ashar, E.W. Gomez, Matrix rigidity mediates TGF $\beta$ 1-induced epithelial-myofibroblast transition by controlling cytoskeletal organization and MRF1-A localization, *J. Cell. Physiol.* **230** (2015) 1829-1839.
- [49] E.N. Olson and A. Nordheim, Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11** (2010) 353-365.
- [50] G.J. Pageau, L.L. Hall, S. Ganesan, D.M. Livingston, J.B. Lawrence, The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers, *Nat. Rev. Cancer* **7** (2007) :628-633.
- [51] D. Paul and G.H. Schmidt, Immortalization and malignant transformation of differentiated cells by oncogenes in vitro and in transgenic mice, *Crit. Rev. Oncog.* **1** (1989) 307-321.
- [52] A.O. Pisco and S. Huang, Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse : 'What does not kill me strengthens me', *Br. J. Cancer* **112** (2015) 1725-1732.
- [53] K. Podsypanina, Y.C. Du, M. Jechlinger, L.J. Beverly, D. Hambardzumyan and H. Varmus, Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung, *Science* **321** (2008) 1841-1844.
- [54] P. Ruiz and U. Gnthert, The cellular basis of metastasis. *World J. Urol.* **14** (1996) 141-150.
- [55] L. Salvany, J. Muller, E. Guccione and P. Rørth, The core and conserved role of MAL is homeostatic regulation of actin levels. *Genes Dev.* **28** (2014) 1048-1053.
- [56] M.A. Scharenberg, R. Chiquet-Ehrismann and M.B. Asparuhova, Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1) : Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **42** (2010) 1911-1914.
- [57] L.J. Schmidt, K. Duncan, N. Yadav, K.M. Regan, A.R. Verone, C.M. Lohse, E.A. Pop, K. Attwood, G. Wilding, J.L. Mohler, T.J. Sebo, D.J. Tindall and H.V. Heemers, RhoA as a mediator of clinically relevant androgen action in prostate cancer cells, *Mol. Endocrinol.* **26** (2012) 716-735.
- [58] A. Selvaraj and R. Prywes, Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41977-41987.
- [59] A. Selvaraj and R. Prywes, Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent, *BMC Mol. Biol.* **5** (2004) 13.
- [60] P. Speight, H. Nakano, T.J. Kelley, B. Hinz, A. Kapus, Differential topical susceptibility to TGF $\beta$  in intact and injured regions of the epithelium : key role in myofibroblast transition, *Mol. Biol. Cell.* **24** (2013) 3326-3336.
- [61] J.M. Slack, Conrad Hal Waddington : the last Renaissance biologist? *Nat. Rev. Genet.* **3** (2002) 889-895.
- [62] W.L. Tam and R.A. Weinberg, The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer, *Nat. Med.* **19** (2013) 1438-1449.
- [63] M. Tian, J.R. Neil and W.P. Schiemann, Transforming growth factor- $\beta$  and the hallmarks of cancer, *Cell Signal* **23** (2011) 951-962.
- [64] C. Tomasetti and B. Vogelstein, Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions, *Science* **347** (2015) 78-81.
- [65] S. Varum, A.S. Rodrigues, M.B. Moura, O. Momcilovic, C.A. Easley 4th, J. Ramalho-Santos, B. Van Houten and G. Schatten, Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts, *PLoS One* **6** (2011) e20914.
- [66] L. Verset, J. Tommelein, X. Moles Lopez, C. Decaestecker, M. Mareel, M. Bracke, I. Salmon, O. De Wever and P. Demetter, Epithelial expression of FHL2 is negatively associated with metastasis-free and overall survival in colorectal cancer, *Br. J. Cancer* **109** (2013) 114-120.
- [67] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz Jr and K.W. Kinzler, Cancer genome landscapes, *Science* **339** (2013) 1546-1558.
- [68] D. Wang, P.S. Chang, Z. Wang, L. Sutherland, J.A. Richardson, E. Small, P.A. Krieg and E.N. Olson, Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor, *Cell* **105** (2001) 851-862.
- [69] D.Z. Wang, S. Li, D. Hockemeyer, L. Sutherland, Z. Wang, G. Schratt, J.A. Richardson, A. Nordheim and E.N. Olson, Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002) 14855-14860.
- [70] Z. Wang, D.Z. Wang, G.C. Pipes and E.N. Olson. 2003. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003) 7129-7134.

- [71] Z. Wang, D.Z. Wang, D. Hockemeyer, J. McAnally, A. Nordheim and E.N. Olson, Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression, *Nature* **428** (2004) 185-189.
- [72] M.A. Wozniak, C.Q. Cheng, C.J. Shen, L. Gao, A.O. Olarerin-George, K.J. Won, J.B. Hogenesch, C.S. Chen, Adhesion regulates MAP kinase/ternary complex factor exchange to control a proliferative transcriptional switch, *Curr. Biol.* **22** (2012) 2017-2026.
- [73] K. Yamazaki, Y. Masugi, K. Effendi, H. Tsujikawa, N. Hiraoka, M. Kitago, M. Shinoda, O. Itano, M. Tanabe, Y. Kitagawa and M. Sakamoto. 2014. Upregulated SMAD3 promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab. Invest.* **94** (2014) 683-691
- [74] S. Yang, L. Liu, P. Xu and Z. Yang, MKL1 inhibits cell cycle progression through p21 in podocytes, *BMC Mol. Biol.* **12** (2015) 16 :1.
- [75] X. Ye, W.L. Tam, T. Shibue, Y. Kaygusuz, F. Reinhardt, E. Ng Eaton and R.A. Weinberg, 2015. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells, *Nature* **525** (2015) 256-260.
- [76] Y. Yokoyama, M. Hieda, Y. Nishioka, A. Matsumoto, S. Higashi, H. Kimura, H. Yamamoto, M. Mori, S. Matsuura and N. Matsuura, Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo, *Cancer Sci.* **104** (2013) 889-895.
- [77] A.I. Zaromytidou, F. Miralles, R. Treisman, MAL and ternary complex factor use different mechanisms to contact a common surface on the serum response factor DNA-binding domain, *Mol. Cell. Biol.* **26** (2006) 4134-4148.
- [78] M. Zeisberg and E.G. Neilson, Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *J. Clin. Invest.* **119** (2009) 1429-1437.

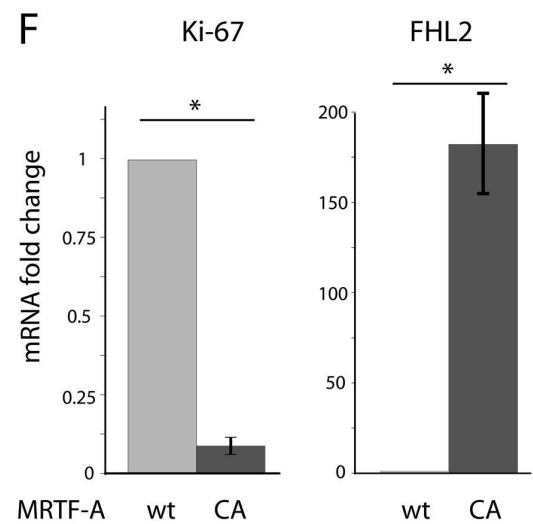
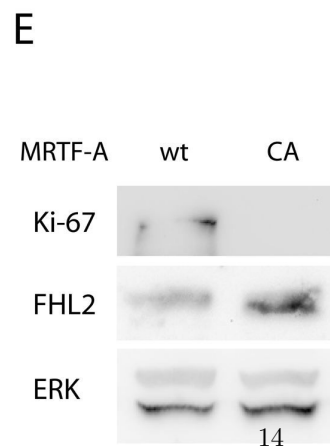
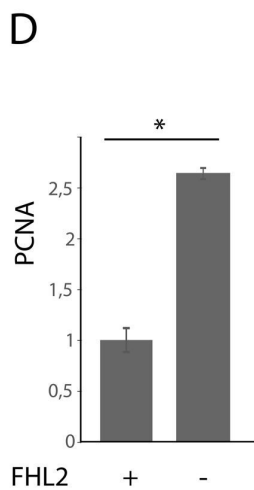
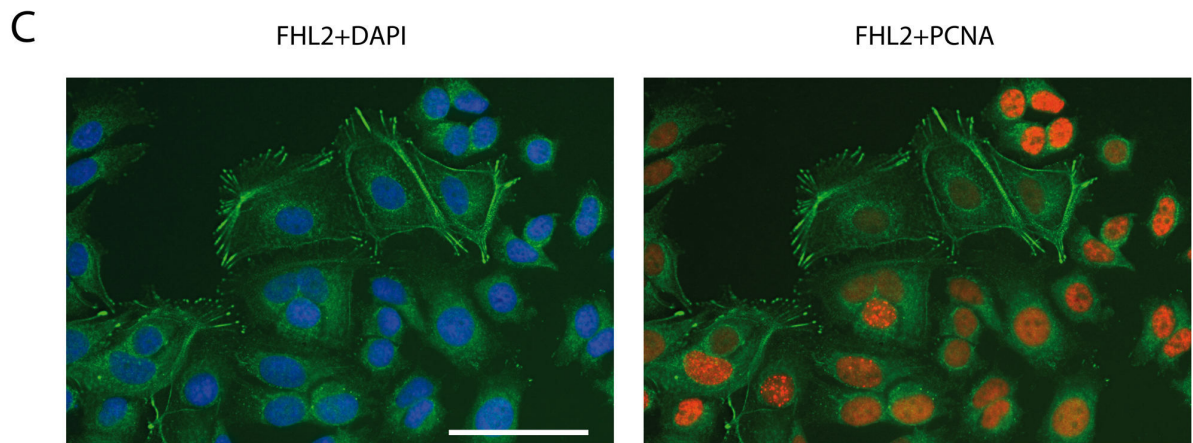
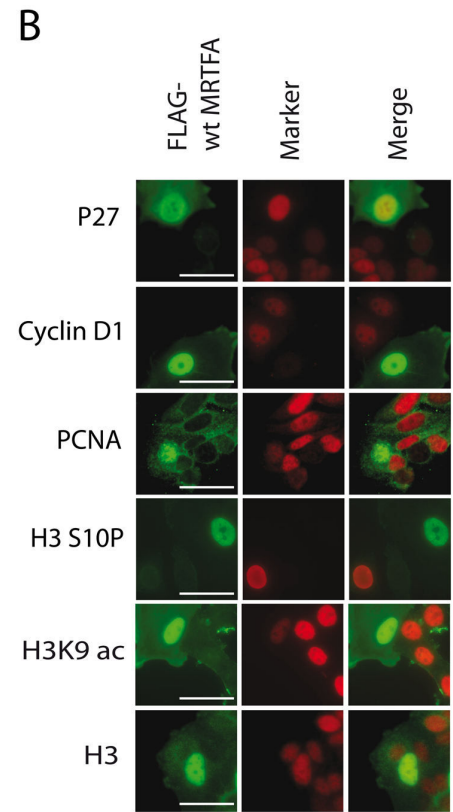
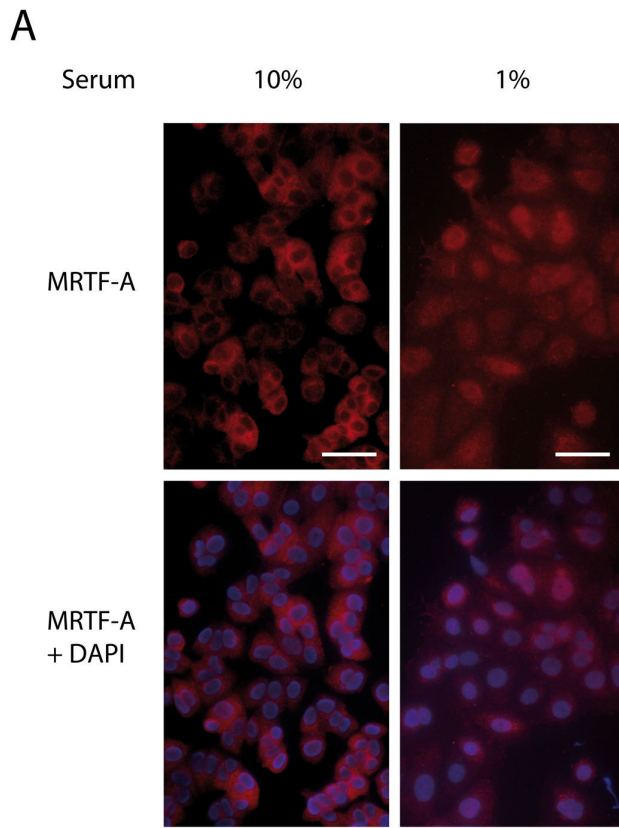
# FIGURES



**Fig. 1.** Epithelial to mesenchymal transition of MCF10A-ER-src cells. (A) Immunostaining before and after induction of the retroviral oncogene v-src, of E-cadherin and of globular and filamentous actin, revealed by DNaseI and phalloidin binding respectively. (B) Endogenous MRTF-A with and without v-src activation. The cells were initially cultured in the same conditions at the same density. The left panels show MRTF-A staining without DAPI to better evaluate its nuclear enrichment. Scales bars = 50 $\mu$ m (C) Global changes of the H3K9 epigenetic marks following v-src induction. (D) Staining intensity of MRTF-A and H3K9me3 in cells cultured at low and high density without oncogene induction. The observed ranges of signal intensities are subdivided into arbitrary intervals and the proportions of cells in each interval are represented in histograms.

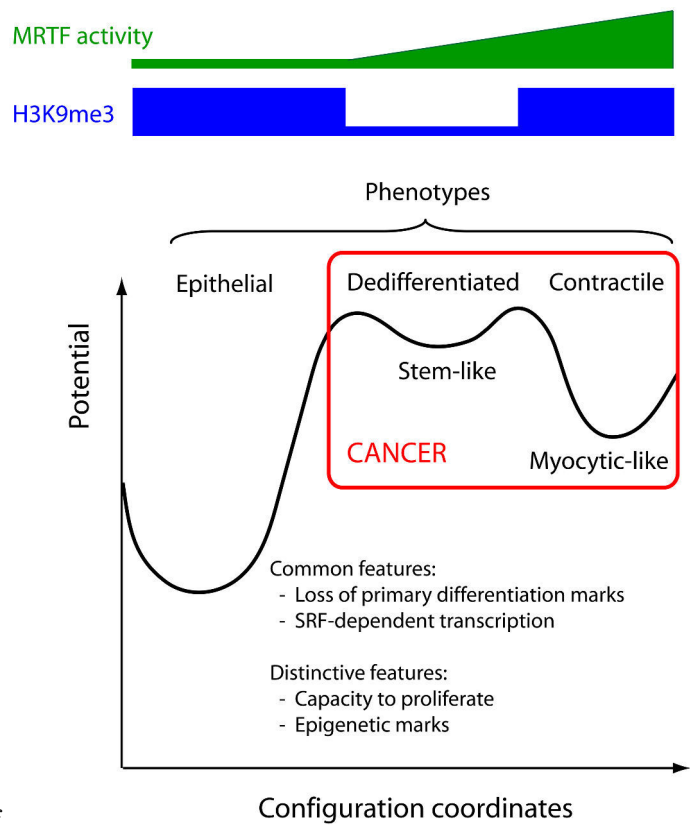


**Fig. 2.** Proliferation-migration balance of MCF7 cells depends on culture conditions. (A) Spreading assays after release of cells densely packed in chambers, in presence of low or high serum concentration. Scales bars = 50 $\mu$ m. (B) Quantification of immunostaining signals obtained in the cell spreading assay in presence of low or high serum concentration.



**Fig. 3.** Migration and proliferation markers upon MRTF-A activation. (A) MRTF-A translocates in the nucleus of MCF7 cultured in presence of low serum concentration. (B) Strong nuclear accumulation of MRTF-A correlates with the loss of proliferation markers. (C) The mutual exclusion of migration and proliferation programs is suggested by the strong decrease of nuclear PCNA staining in cells with intense FHL2 staining and peripheral redistribution. (D) Relative intensity of PCNA immunostaining in FHL2-positive and negative cells distinguished through the presence or absence of FHL2-immunoreactive focal adhesion points, in the experiment visualized in panel (C). Scales bars = 50 $\mu$ m. (E) Immunoblotting detection of the proliferation marker KI-67 and the MRTF-A responsive gene FHL2 mRNAs in MCF7 cells stably over-expressing either the wild type or a constitutively active (CA) mutant MRTF-A molecule. (F) Relative content of the proliferation marker KI-67 and the MRTF-A responsive gene FHL2 mRNAs in the same cells as in (E).





4.pdf

**Fig. 4.** In this schematic Waddington landscape of epithelial cancer, the cellular population covers two cellular states, or attractors : De-differentiated proliferative and trans-differentiated contractile. This duality would explain existing ambiguities in the literature about the differentiation status of cancer. The primary differentiation markers lost during complete dedifferentiation include the estrogen receptor  $\alpha$  for estrogen receptor  $\alpha$ -positive cells.

# BIBLIOGRAPHIE



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, et al (2004) Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol* 203:661–671. doi: 10.1002/path.1559
- Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, et al (2005) Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16:231–237. doi: 10.1091/mbc.E04
- Adlanmerini M, Solinhac R, Abot A, et al (2014) Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions. *Proc Natl Acad Sci* 111:E283–E290. doi: 10.1073/pnas.1322057111
- Al-Safi ZA, Polotsky AJ (2015) Obesity and Menopause. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 29:548–553. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2014.12.002
- Alam MW, Persson CU, Reinbothe S, et al (2016) HIF2 $\alpha$  contributes to antiestrogen resistance via positive bilateral crosstalk with EGFR in breast cancer cells. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.7167
- Albright F, PH S, AM R (1941) Postmenopausal osteoporosis: Its clinical features. *J Am Med Assoc* 116:2465–2474. doi: 10.1001/jama.1941.02820220007002
- Ali S, Metzger D, Bornert J, Chambon P (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO* 12:1153–1160.
- Allen BL, Taatjes DJ (2015) The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16:155–166. doi: 10.1038/nrm3951
- Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, et al (2008) Pancreatic insulin content regulation by the Estrogen receptor ER $\alpha$ . *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0002069
- Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragonés J, et al (2002) Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J Biol Chem* 277:13508–13517. doi: 10.1074/jbc.M200017200
- Anolik JH, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA (1995) Cooperative Binding of Estrogen Receptor to DNA Depends on Spacing of Binding Sites, Flanking Sequence, and Ligand. *Biochemistry* 34:2511–2520. doi: 10.1021/bi00008a015
- Anzick SL, Kononen J, Walker RL, et al (1997) AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* (80- ) 277:965–968.
- Arnal J-F, Lenfant F, Metivier R, et al (2017) Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiol Rev* 97:1045–1087. doi: 10.1152/physrev.00024.2016
- Arnal JF, Fontaine C, Billon-Galés A, et al (2010) Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:1506–1512.

- Arnal JF, Laurell H, Fontaine C, et al (2009) Estrogen receptor actions on vascular biology and inflammation: implications in vascular pathophysiology. *Climacteric* 12 Suppl 1:12–7. doi: 10.1080/13697130902820006
- Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, et al (2005) Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res* 11:4003–4011. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2064
- Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschläger M, et al (1998) Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J* 17:6289–6299. doi: 10.1093/emboj/17.21.6289
- Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Celeste Simon M (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling is neither required for hypoxic stabilization of HIF-1 $\alpha$  nor sufficient for HIF-1-dependent target gene transcription. *J Biol Chem* 277:15162–15170. doi: 10.1074/jbc.M111162200
- Arsham AM, Plas DR, Thompson CB, Simon MC (2004) Akt and hypoxia-inducible factor-1 independently enhance tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 64:3500–3507. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2239
- Asselin-Labat M-L, Sutherland KD, Barker H, et al (2007) Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 9:201–209. doi: 10.1038/ncb1530
- Asselin-Labat ML, Vaillant F, Shackleton M, et al (2008) Delineating the epithelial hierarchy in the mouse mammary gland. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. pp 469–478
- Atsriku C, Britton DJ, Held JM, et al (2009) Systematic mapping of posttranslational modifications in human estrogen receptor- $\alpha$  with emphasis on novel phosphorylation sites. *Mol Cell Proteomics* 8:467–480. doi: 10.1074/mcp.M800282-MCP200
- Auricchio F, Migliaccio A, Castoria G, et al (1984) Direct evidence of in vitro phosphorylation-dephosphorylation of the estradiol-17 $\beta$  receptor. role of Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin in the activation of hormone binding sites. *J Steroid Biochem* 20:31–35. doi: 10.1016/0022-4731(84)90185-7
- Auricchio F, Migliaccio A, Di Domenico M, Nola E (1987) Oestradiol stimulates tyrosine phosphorylation and hormone binding activity of its own receptor in a cell-free system.
- Baarlink C, Wang H, Grosse R (2013) Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science* 340:864–7. doi: 10.1126/science.1235038
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al (2011) Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol* 24:157–167. doi: 10.1038/modpathol.2010.200
- Bakker WJ, Harris IS, Mak TW (2007) FOXO3a Is Activated in Response to Hypoxic Stress and Inhibits HIF1-Induced Apoptosis via Regulation of CITED2. *Mol Cell* 28:941–953. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.035
- Bandyopadhyay A, Wang L, Chin SH, Sun L-Z (2007) Inhibition of skeletal metastasis by ectopic ER $\alpha$  expression in ER $\alpha$ -negative human breast cancer cell lines. *Neoplasia* 9:113–8. doi: 10.1593/neo.06784
- Baselga J, Im S-A, Iwata H, et al (2017) Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 1–13. doi:

10.1016/S1470-2045(17)30376-5

- Belandia B, Orford RL, Hurst HC, Parker MG (2002) Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *EMBO J* 21:4094–4103. doi: 10.1093/emboj/cdf412
- Bellizzi A, Mangia A, Chiriatti A, et al (2008) RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *Int J Mol Med* 22:25–31.
- Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al (1992) Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24:85–95. doi: 10.1007/BF01961241
- Bernardo GM, Lozada KL, Miedler JD, et al (2010) FOXA1 is an essential determinant of ER expression and mammary ductal morphogenesis. *Development* 137:2045–2054. doi: 10.1242/dev.043299
- Berry M, Metzger D, Chambon P (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9:2811–2818.
- Bhadriraju K, Yang M, Alom Ruiz S, et al (2007) Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Exp Cell Res* 313:3616–3623. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.07.002
- Billon-Galés A, Fontaine C, Filipe C, et al (2009) The transactivating function 1 of estrogen receptor alpha is dispensable for the vasculoprotective actions of 17beta-estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2053–8. doi: 10.1073/pnas.0808742106
- Blazek E, Mittler G, Meisterernst M (2005) The mediator of RNA polymerase II. *Chromosoma* 113:399–408.
- Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, et al (1989) The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 17:2581–2595. doi: 10.1093/nar/17.7.2581
- Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, et al (2011) Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0020898
- Bouris P, Skandalis SS, Piperigkou Z, et al (2015) Estrogen receptor alpha mediates epithelial to mesenchymal transition, expression of specific matrix effectors and functional properties of breast cancer cells. *Matrix Biol* 43:42–60. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.008
- Bregeon J, Loirand G, Pacaud P, Rolli-Derkinderen M (2009) Angiotensin II induces RhoA activation through SHP2-dependent dephosphorylation of the RhoGAP p190A in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C1062-70. doi: 10.1152/ajpcell.00174.2009
- Briskin C, O'Malley B (2010) Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:
- Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, et al (2006) Bidirectional cross talk between ER?? and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* 96:131–146. doi: 10.1007/s10549-005-9070-2
- Bruna A, Rueda OM, Greenwood W, et al (2016) A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intra-tumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell* 167:260–274.e22. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.041

- 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* 15:2174–83. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.018
- Busche S, Descot A, Julien S, et al (2008) Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling. *J Cell Sci* 121:1025–1035. doi: 10.1242/jcs.014456
- Busche S, Kremmer E, Posern G (2010) E-cadherin regulates MAL-SRF-mediated transcription in epithelial cells. *J Cell Sci* 123:2803–9. doi: 10.1242/jcs.061887
- Butler JEF, Kadonaga JT (2002) The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes Dev* 16:2583–2592. doi: 10.1101/gad.1026202.The
- Caizzi L, Ferrero G, Cutrupi S, et al (2014) Genome-wide activity of unliganded estrogen receptor- $\alpha$  in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:1–6. doi: 10.1073/pnas.1315445111
- Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, et al (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor  $\alpha$ : A new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817–9824. doi: 10.1074/jbc.M010840200
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al (2006) Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 295:2492. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, et al (1998) Role of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394:485–90. doi: 10.1038/28867
- Carmeliet P, Moons L, Luttun a, et al (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7:575–83. doi: 10.1038/87904
- Carroll JS, Meyer C a, Song J, et al (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38:1289–1297. doi: 10.1038/ng1901
- Carson-Jurica MA, Schrader WT, O'Malley BW (1990) Steroid receptor family: structure and functions. *Endocr Rev* 11:201–220.
- Casimiro MC, Wang C, Li Z, et al (2013) Cyclin D1 Determines Estrogen Signaling in the Mammary Gland In Vivo. *Mol Endocrinol* 27:1415–1428. doi: 10.1210/me.2013-1065
- Casolari DA, Pereira MC, De Bessa Garcia SA, Nagai MA (2011) Insulin-like growth factor-1 and 17 $\beta$ -estradiol down-regulate prostate apoptosis response-4 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Mol Med* 28:337–342. doi: 10.3892/ijmm.2011.691
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, et al (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050–6059. doi: 10.1093/emboj/20.21.6050
- Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, et al (1997) 17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res* 81:885–892.
- Chan CMW, Martin LA, Johnston SRD, et al (2002) Molecular changes associated with the acquisition of oestrogen hypersensitivity in MCF-7 breast cancer cells on long-term oestrogen deprivation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 81:333–341. doi: 10.1016/S0960-0760(02)00074-2

- Chantalat E, Boudou F, Laurell H, et al (2016) The AF-1-deficient estrogen receptor ER $\alpha$ 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. *Breast Cancer Res* 18:123. doi: 10.1186/s13058-016-0780-7
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D (2009a) Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer* 9:202. doi: 10.1186/1471-2407-9-202
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, et al (2009b) Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res* 69:1302–1313. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2741
- Chaudhri RA, Hadadi A, Lobachev KS, et al (2014) Estrogen receptor-alpha 36 mediates the anti-apoptotic effect of estradiol in triple negative breast cancer cells via a membrane-associated mechanism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843:2796–2806. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.07.019
- Chaudhri RA, Olivares-Navarrete R, Cuenca N, et al (2012) Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- $\alpha$ 36 (ER $\alpha$ 36). *J Biol Chem* 287:7169–7181. doi: 10.1074/jbc.M111.292946
- Chen JR, Hsieh TY, Chen HY, et al (2014) Absence of estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification in a series of breast cancers in Taiwan. *Virchows Arch* 464:689–699. doi: 10.1007/s00428-014-1576-8
- Cheng X, Yang Y, Fan Z, et al (2015) MKL1 potentiates lung cancer cell migration and invasion by epigenetically activating MMP9 transcription. *Oncogene* 1–12. doi: 10.1038/onc.2015.14
- Chiang AC, Massagué J (2008) Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med* 359:2814–2823. doi: 10.1056/NEJMra0805239
- Chiu J-H, Wen C-S, Wang J-Y, et al (2017) Role of estrogen receptors and Src signaling in mechanisms of bone metastasis by estrogen receptor positive breast cancers. *J Transl Med* 15:97. doi: 10.1186/s12967-017-1192-x
- Cho J, Bahn JJ, Park M, et al (2006) Hypoxic activation of unoccupied estrogen-receptor-alpha is mediated by hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 100:18–23. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.03.002
- Cho J, Kim D, Lee S, Lee Y (2005) Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 19:1191–1199. doi: 10.1210/me.2004-0162
- Ciarloni L, Mallepell S, Brisken C (2007) Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5455–60. doi: 10.1073/pnas.0611647104
- Cicatiello L, Scafoglio C, Altucci L, et al (2004) A genomic view of estrogen actions in human breast cancer cells by expression profiling of the hormone-responsive transcriptome. *J. Mol. Endocrinol.* 32:719–775.
- Cipro Š, Hřebačková J, Hraběta J, et al (2012) Valproic acid overcomes hypoxia-induced resistance to apoptosis. *Oncol Rep* 27:1219–1226. doi: 10.3892/or.2011.1577
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, et al (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* 9:279–289. doi: 10.1016/S1097-



- Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM (2015) Endocrine resistance in breast cancer - An overview and update. *Mol Cell Endocrinol* 418:220–234. doi: 10.1016/j.mce.2015.09.035
- Cloos PAC, Christensen J, Agger K, et al (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* 442:307–311. doi: 10.1038/nature04837
- Comerford KM, Wallace TJ, Karhausen J, et al (2002) Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* 62:3387–3394.
- Cooper C, Liu G-Y, Niu Y-L, et al (2004) Intermittent hypoxia induces proteasome-dependent down-regulation of estrogen receptor  $\alpha$  in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1235
- Copeland JW, Treisman R (2002) The Diaphanous-related Formin mDia1 Controls Serum Response Factor Activity through its Effects on Actin Polymerization. *Mol Biol Cell* 13:4088–4099. doi: 10.1091/mbc.02
- Couse JF, Korach KS (1999) Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20:358–417.
- Cui J, Germer K, Wu T, et al (2012) Cross-talk between HER2 and MED1 regulates tamoxifen resistance of human breast cancer cells. *Cancer Res* 72:5625–5634. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1305
- Cutrupi S, Reineri S, Panetto a, et al (2012) Targeting of the adaptor protein Tab2 as a novel approach to revert tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 31:4420–4420. doi: 10.1038/onc.2012.95
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008) The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 7:11–20.
- Deeb G, Vaughan MM, McInnis I, et al (2011) Hypoxia-inducible factor-1?? protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 35:579–584. doi: 10.1016/j.leukres.2010.10.020
- DeMichele A, Troxel AB, Berlin JA, et al (2008) Impact of raloxifene or tamoxifen use on endometrial cancer risk: A population-based case-control study. *J Clin Oncol* 26:4151–4159. doi: 10.1200/JCO.2007.14.0921
- Dey P, Jonsson P, Hartman J, et al (2012) Estrogen receptors  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 have opposing roles in regulating proliferation and bone metastasis genes in the prostate cancer cell line PC3. *Mol Endocrinol* 26:1991–2003. doi: 10.1210/me.2012.1227
- Dhamad AE, Zhou Z, Zhou J, Du Y (2016) Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha (ER $\alpha$ ) and Biochemical Characterization of the ER $\alpha$ - Hsp70 Interaction. *PLoS One* 11:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0160312
- Di Conza G, Trusso Cafarello S, Lorocho S, et al (2017) The mTOR and PP2A Pathways Regulate PHD2 Phosphorylation to Fine-Tune HIF1?? Levels and Colorectal Cancer Cell Survival under Hypoxia. *Cell Rep* 18:1699–1712. doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.051
- Dickson RB, McManaway ME, Lippman ME (1986) Estrogen-induced factors of breast cancer cells partially replace estrogen to promote tumor growth. *Science* (80- ) 232:1540–1543.

- Dobrolecki LE, Airhart SD, Alferez DG, et al (2016) Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 35:547–573. doi: 10.1007/s10555-016-9653-x
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, et al (2003) Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. In: *Endocrine-Related Cancer*. pp 179–186
- Doktorova H, Hrabeta J, Khalil MA, Eckschlager T (2015) Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap* 159:166–177. doi: 10.5507/bp.2015.025
- Dolwick KM, Swanson HI, Bradfield CA (1993) In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8566–8570. doi: 10.1073/pnas.90.18.8566
- Dostie J, Richmond TA, Arnaout RA, et al (2006) Chromosome Conformation Capture Carbon Copy (5C): A massively parallel solution for mapping interactions between genomic elements. *Genome Res* 16:1299–1309. doi: 10.1101/gr.5571506
- Drummond AE, Findlay JK (1999) The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151:57–64.
- Du R, Lu K V., Petritsch C, et al (2008) HIF1 $\alpha$  Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion. *Cancer Cell* 13:206–220. doi: 10.1016/j.ccr.2008.01.034
- Dutertre M, Smith CL (2003) Ligand-Independent Interactions of p160/Steroid Receptor Coactivators and CREB-Binding Protein (CBP) with Estrogen Receptor- $\alpha$ : Regulation by Phosphorylation Sites in the A/B Region Depends on Other Receptor Domains. *Mol Endocrinol* 17:1296–1314. doi: 10.1210/me.2001-0316
- Eeckhoutte J, Keeton EK, Lupien M, et al (2007) Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor ?? expression in breast cancer. *Cancer Res* 67:6477–6483. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0746
- Endoh H, Maruyama K, Masuhiro Y, et al (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19:5363–72. doi: 10.1002/minf.201100127
- Engler-Chiurazzi EB, Brown CM, Povroznik JM, Simpkins JW (2015) Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Prog. Neurobiol.*
- Escriva H, Safi R, Hänni C, et al (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6803–6808. doi: 10.1073/pnas.94.13.6803
- Fagan DH, Uselman RR, Sachdev D, Yee D (2012) Acquired resistance to tamoxifen is associated with loss of the type I insulin-like growth factor receptor: Implications for breast cancer treatment. *Cancer Res* 72:3372–3380. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0684
- Fagan DH, Yee D (2008) Crosstalk between IGF1R and estrogen receptor signaling in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13:423–429.
- Felipe Lima J, Nofech-Mozes S, Bayani J, Bartlett J (2016) EMT in Breast Carcinoma—A Review. *J Clin Med* 5:65. doi: 10.3390/jcm5070065
- Feng CC, Lin CC, Lai YP, et al (2016) Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 $\alpha$ -

- IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression. *Growth Factors* 34:73–86. doi: 10.1080/08977194.2016.1191480
- Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, et al (1998) Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* (80- ) 280:1747–1749. doi: 10.1126/science.280.5370.1747
- Feng Y, Manka D, Wagner K-U, Khan SA (2007) Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14718–23. doi: 10.1073/pnas.0706933104
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR (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. doi: 10.1210/mend.14.10.0532
- Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Bland KI (2002) Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Mol Endocrinol* 16:70–84. doi: 10.1210/mend.16.1.0758
- Finn RS (2008) Targeting Src in breast cancer. *Ann. Oncol.* 19:1379–1386.
- Flouriot G, Brand H, Denger S, et al (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. doi: 10.1093/emboj/19.17.4688
- Flouriot G, Huet G, Demay F, et al (2014) The actin/MKL1 signalling pathway influences cell growth and gene expression through large-scale chromatin reorganization and histone post-translational modifications. *Biochem J* 461:257–68. doi: 10.1042/BJ20131240
- Fluegen G, Avivar-Valderas A, Wang Y, et al (2017) Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. *Nat Cell Biol* 1–6. doi: 10.1038/ncb3465
- Font de Mora J, Brown M (2000) AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 20:5041–7. doi: 10.1128/MCB.20.14.5041-5047.2000
- Foryst-Ludwig A, Kintscher U (2010) Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122:74–81.
- Foster JS, Fernando RI, Ishida N, et al (2003) Estrogens Down-regulate p27Kip1 in Breast Cancer Cells through Skp2 and through Nuclear Export Mediated by the ERK Pathway. *J Biol Chem* 278:41355–41366. doi: 10.1074/jbc.M302830200
- Fu X, Jeselsohn R, Pereira R, et al (2016) FOXA1 overexpression mediates endocrine resistance by altering the ER transcriptome and IL-8 expression in ER-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 113:E6600–E6609. doi: 10.1073/pnas.1612835113
- Fuady JH, Gutsche K, Santambrogio S, et al (2016) Estrogen-dependent downregulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-2` in invasive breast cancer cells. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.8866
- Garc??a-Becerra R, Santos N, D??az L, Camacho J (2013) Mechanisms of resistance to endocrine

- therapy in breast cancer: Focus on signaling pathways, miRNAs and genetically based resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 14:108–145.
- Generali D, Buffa FM, Berruti A, et al (2009) Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 27:227–34. doi: 10.1200/JCO.2007.13.7083
- Germain D (2011) Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 40:473–484.
- Gilkes DM, Xiang L, Lee SJ, et al (2014) Hypoxia-inducible factors mediate coordinated RhoA-ROCK1 expression and signaling in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E384–93. doi: 10.1073/pnas.1321510111
- Girault I, Lerebours F, Amarir S, et al (2003) Expression analysis of estrogen receptor  $\alpha$  coregulators in breast carcinoma: Evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clin Cancer Res* 9:1259–1266.
- Goel S, Wang Q, Watt AC, et al (2016) Overcoming Therapeutic Resistance in HER2-Positive Breast Cancers with CDK4/6 Inhibitors. *Cancer Cell* 29:255–269. doi: 10.1016/j.ccell.2016.02.006
- Goldstein SW, Bordner J, Hoth LR, Geoghegan KF (2001) Chemical and biochemical issues related to X-ray crystallography of the ligand-binding domain of estrogen receptor alpha. *Bioconjug Chem* 12:406–13. doi: bc000127d [pii]
- Gray C a, Bartol FF, Tarleton BJ, et al (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65:1311–1323. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1311
- Green S, Walter P, Kumar V, et al (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134–9. doi: 10.1038/320134a0
- Gregoraszczyk E, Ptak a (2011) Involvement of caspase-9 but not caspase-8 in the anti-apoptotic effects of estradiol and 4-OH-Estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocr Regul* 45:3–8. doi: 10.4149/endo
- Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, et al (1996) Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease [see comments] [published erratum appears in *N Engl J Med* 1996 Oct 31;335(18):1406]. *N Engl J Med* 335:453–461.
- Gruvberger-Saal SK, Bendahl P-O, Saal LH, et al (2007) Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:1987–94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1823
- Guidozzi F (2013) Sleep and sleep disorders in menopausal women. *Climacteric* 16:214–9. doi: 10.3109/13697137.2012.753873
- Guillaume H, Yohann M, Frédéric P, et al (2009) Repression of the Estrogen Receptor- $\alpha$  Transcriptional Activity by the Rho/Megakaryoblastic Leukemia 1 Signaling Pathway. *J Biol Chem* 284:33729–33739. doi: 10.1074/jbc.M109.045534
- Guiu S, Michiels S, André F, et al (2012) Molecular subclasses of breast cancer: How do we define them? The IMPAKT 2012 working group statement. *Ann. Oncol.* 23:2997–3006.
- Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, et al (2012) Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* 148:1015–1028. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.008

- Gusterson B a, Ross DT, Heath VJ, Stein T (2005) Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:143–148. doi: 10.1186/bcr1041
- Hall JM, Korach KS (2003) Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17:792–803. doi: 10.1210/me.2002-0438
- Han B, Bhowmick N, Qu Y, et al (2017) FOXC1: an emerging marker and therapeutic target for cancer. *Oncogene* 36:3957–3963. doi: 10.1038/onc.2017.48
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57–70. doi: 10.1007/s00262-010-0968-0
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harigopal M, Heymann J, Ghosh S, et al (2009) Estrogen receptor co-activator (AIB1) protein expression by automated quantitative analysis (AQUA) in a breast cancer tissue microarray and association with patient outcome. *Breast Cancer Res Treat* 115:77–85. doi: 10.1007/s10549-008-0063-9
- Harrington WR, Kim SH, Funk CC, et al (2006) Estrogen Dendrimer Conjugates that Preferentially Activate Extranuclear, Nongenomic *Versus* Genomic Pathways of Estrogen Action. *Mol Endocrinol* 20:491–502. doi: 10.1210/me.2005-0186
- Hartman J, Edvardsson K, Lindberg K, et al (2009) Tumor repressive functions of estrogen receptor ?? in SW480 colon cancer cells. *Cancer Res* 69:6100–6106. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0506
- Hasegawa N, Sumitomo A, Fujita A, et al (2012) Mediator Subunits MED1 and MED24 Cooperatively Contribute to Pubertal Mammary Gland Development and Growth of Breast Carcinoma Cells. *Mol Cell Biol* 32:1483–1495. doi: 10.1128/MCB.05245-11
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, et al (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* 39:311–318. doi: 10.1038/ng1966
- Higashimura Y, Kitakaze T, Harada N, et al (2016) pVHL-mediated degradation of HIF-2 $\alpha$  regulates estrogen receptor  $\alpha$  expression in normoxic breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2690–2699.
- Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81:1159–1170. doi: 10.1016/S0092-8674(05)80020-0
- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al (2006) Recruitment of HIF-1 alpha and HIF-2 alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2 alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10:413–423. doi: 10.1016/j.ccr.2006.08.026
- Hoppe-Seyler K, Bossler F, Lohrey C, et al (2017) Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E990–E998. doi: 10.1073/pnas.1615758114
- Hu Q, Guo C, Li Y, et al (2011) LMO7 mediates cell-specific activation of the Rho-myocardin-related transcription factor-serum response factor pathway and plays an important role in breast cancer cell migration. *Mol Cell Biol* 31:3223–40. doi: 10.1128/MCB.01365-10
- Huang P, Chandra V, Rastinejad F (2010) Structural overview of the nuclear receptor superfamily:

- insights into physiology and therapeutics. *Annu Rev Physiol* 72:247–72. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135917
- Huet G, Mérot Y, Le Dily F, et al (2008) Loss of E-cadherin-mediated cell contacts reduces estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) transcriptional efficiency by affecting the respective contribution exerted by AF1 and AF2 transactivation functions. *Biochem Biophys Res Commun* 365:304–309. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.178
- Hurbin A, Dubrez L, Coll J-L, Favrot M-C (2002) Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 277:49127–49133. doi: 10.1074/jbc.M207584200
- Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, et al (2011) FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 43:27–33. doi: 10.1038/ng.730
- Ishikawa T, Nakashiro KI, Klosek SK, et al (2009) Hypoxia enhances CXCR4 expression by activating HIF-1 in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 21:707–712. doi: 10.3892/or\_00000275
- Ishimine H, Yamakawa N, Sasao M, et al (2013) N-Cadherin is a prospective cell surface marker of human mesenchymal stem cells that have high ability for cardiomyocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 438:753–759. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.081
- Ito I, Hanyu A, Wayama M, et al (2010) Estrogen inhibits transforming growth factor  $\beta$  signaling by promoting Smad2/3 degradation. *J Biol Chem* 285:14747–14755. doi: 10.1074/jbc.M109.093039
- Iwase H, Yamamoto Y (2015) Clinical benefit of sequential use of endocrine therapies for metastatic breast cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 20:253–261.
- Jehanno C, Flouriot G, Le Goff P, Michel D (2017) A model of dynamic stability of H3K9me3 heterochromatin to explain the resistance to reprogramming of differentiated cells. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1860:184–195. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.11.006
- Jehanno C, Flouriot G, Nicol-Benoit F, et al (2016) Envisioning metastasis as a transdifferentiation phenomenon clarifies discordant results on cancer. *Breast Dis* 36:47–59. doi: 10.3233/BD-150210
- Jensen E V (1962) On the Mechanism of Estrogen Action. *Perspect Biol Med* 6:47–60. doi: 10.1353/pbm.1963.0005
- Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al (2014) Emergence of constitutively active estrogen receptor- $\alpha$  mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 20:1757–67. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2332
- Jia X, Hong Q, Lei L, et al (2015) Basal and therapy-driven hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  confers resistance to endocrine therapy in estrogen receptor-positive breast. *Oncotarget* 6:8648–8662. doi: 10.18632/oncotarget.3257
- Johannessen M, Møller S, Hansen T, et al (2006) The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:268–284.
- Johnson AB, Denko N, Barton MC (2008) Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 640:174–179. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.01.001
- Jordan VC (2003) Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. *J. Med. Chem.* 46:883–908.

- Joshi S, Singh AR, Durden DL (2014) MDM2 regulates hypoxic hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stability in an E3 ligase, proteasome, and PTEN-phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-dependent manner. *J Biol Chem* 289:22785–22797. doi: 10.1074/jbc.M114.587493
- Jung YS, Lee SJ, Yoon MH, et al (2012) Estrogen receptor ?? is a novel target of the Von Hippel-Lindau protein and is responsible for the proliferation of VHL-deficient cells under hypoxic conditions. *Cell Cycle* 11:4462–4473. doi: 10.4161/cc.22794
- Kaelin WG, Ratcliffe PJ (2008) Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Mol. Cell* 30:393–402.
- Kanczuga-Koda L, Koda M, Tomaszewski J, et al (2010) ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in correlation with Ki-67, Bcl-2 and Bak in primary tumors and lymph node metastases of breast cancer: The effect of pre-operative chemotherapy. *Oncol Lett* 1:1067–1071. doi: 10.3892/ol.2010.178
- Kenneth NS, Mudie S, van Uden P, Rocha S (2009) SWI/SNF regulates the cellular response to hypoxia. *J Biol Chem* 284:4123–31. doi: 10.1074/jbc.M808491200
- Kerdivel G, Boudot A, Habauzit D, et al (2014) Activation of the MKL1/actin signaling pathway induces hormonal escape in estrogen-responsive breast cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 390:34–44. doi: 10.1016/j.mce.2014.03.009
- Kern FG, McLeskey SW, Zhang L, et al (1994) Transfected MCF-7 cells as a model for breast-cancer progression. *Breast Cancer Res Treat* 31:153–165.
- Khosla S (2010) Update on estrogens and the skeleton. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95:3569–3577.
- Kim J, Lee J, Kim C, et al (2016) Anti-cancer effect of metformin by suppressing signaling pathway of HER2 and HER3 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Tumor Biol* 37:5811–5819. doi: 10.1007/s13277-015-4440-9
- Kim MY, Woo EM, Chong YTE, et al (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. doi: 10.1210/me.2005-0531
- Klinge CM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, et al (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. doi: 10.1016/j.mce.2010.03.013
- Knowlden JM, Hutcheson IR, Barrow D, et al (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. doi: 10.1210/en.2005-0247
- Koh MY, Lemos R, Liu XX-P, Powis G (2011) The hypoxia associated factor (HAF) switches cells from HIF-1 $\alpha$  to HIF-2 $\alpha$  dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion.pdf. *Cancer Res* 71:4015–27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4142
- Koh MY, Powis G (2012) Passing the baton: The HIF switch. *Trends Biochem. Sci.* 37:364–372.
- Korach KS, Couse JF, Curtis SW, et al (1996) Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res* 51:158–159.
- Krust A, Green S, Argos' P, et al (1986) The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 5:891–897.

- Kryczek I, Wei S, Keller E, et al (2007) Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C987–C995. doi: 10.1152/ajpcell.00406.2006
- Kumar V, Chambon P (1988) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 55:145–156. doi: 10.1016/0092-8674(88)90017-7
- Kumar V, Green S, Stack G, et al (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51:941–951. doi: 10.1016/0092-8674(87)90581-2
- Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, et al (2004) Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4966–71. doi: 10.1073/pnas.0401064101
- Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H (2001) Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 92:1093–1101. doi: 10.1111/j.1349-7006.2001.tb01064.x
- Lai A, Sarcevic B, Prall OW, Sutherland RL (2001) Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *J Biol Chem* 276:25823–25833. doi: 10.1074/jbc.M100925200
- LaMarca HL, Rosen JM (2007) Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage. *Breast Cancer Res* 9:304. doi: 10.1186/bcr1740
- Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA (2017) Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168:670–691.
- Lane J, Martin TA, Watkins G, et al (2008) The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol* 33:585–593. doi: 10.3892/ijo\_00000044
- Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, et al (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 273:L119–L126.
- Latil M, Rocheteau P, Châtre L, et al (2012) Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat Commun* 3:903. doi: 10.1038/ncomms1890
- Lau EYT, Ho NPY, Lee TKW (2017) Cancer stem cells and their microenvironment: Biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int*. 2017:
- Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, et al (1998) Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2920–5. doi: 10.1073/pnas.95.6.2920
- Le Dily FL, Baù D, Pohl A, et al (2014) Distinct structural transitions of chromatin topological domains correlate with coordinated hormone-induced gene regulation. *Genes Dev* 28:2151–2162. doi: 10.1101/gad.241422.114
- Le Goff P, Montano MM, Schodin DJ, Katzenellenbogen BS (1994) Phosphorylation of the human estrogen receptor: Identification of hormone-regulated sites and examination of their influence on transcriptional activity. *J Biol Chem* 269:4458–4466.
- Lee CG, Carr MC, Murdoch SJ, et al (2009) Adipokines, inflammation, and visceral adiposity across the menopausal transition: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1104–1110. doi: 10.1210/jc.2008-0701



- Lee J, Tiwari A, Shum V, et al (2014) Unraveling the regulatory connections between two controllers of breast cancer cell fate. *Nucleic Acids Res* 42:6839–6849. doi: 10.1093/nar/gku360
- Lee LMJ, Cao J, Deng H, et al (2008) ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. *Anticancer Res* 28:479–483. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02497.x.Plasma
- Lees JA, Fawell SE, Parker MG (1989) Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J Steroid Biochem* 34:33–39. doi: 10.1016/0022-4731(89)90063-0
- Leygue E, Murphy LC (2013) A bi-faceted role of estrogen receptor  $\beta$  in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 20:
- Li J, O'Malley BW, Wong J (2000) p300 Requires Its Histone Acetyltransferase Activity and SRC-1 Interaction Domain To Facilitate Thyroid Hormone Receptor Activation in Chromatin. *Mol Cell Biol* 20:2031–2042. doi: 10.1128/MCB.20.6.2031-2042.2000
- Li S, Chang S, Qi X, et al (2006) Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol Cell Biol* 26:5797–808. doi: 10.1128/MCB.00211-06
- Li Y, Wang JP, Santen RJ, et al (2010) Estrogen stimulation of cell migration involves multiple signaling pathway interactions. *Endocrinology* 151:5146–5156. doi: 10.1210/en.2009-1506
- Liao XH, Wang N, Liu LY, et al (2014) MRTF-A and STAT3 synergistically promote breast cancer cell migration. *Cell Signal* 26:2370–2380. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.023
- Lim E, Vaillant F, Wu D, et al (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15:907–13. doi: 10.1038/nm.2000
- Lin SL, Yan LY, Zhang XT, et al (2010) ER- $\alpha$ 36, a variant of ER- $\alpha$ , promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0009013
- Liu XF, Bagchi MK (2004) Recruitment of Distinct Chromatin-modifying Complexes by Tamoxifen-complexed Estrogen Receptor at Natural Target Gene Promoters in Vivo. *J Biol Chem* 279:15050–15058. doi: 10.1074/jbc.M311932200
- Liu Y, Zhao Y, Skerry B, et al (2016) Foxa1 is essential for mammary duct formation. *Genesis* 54:277–285. doi: 10.1002/dvg.22929
- Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, et al (1995) Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377:539–544. doi: 10.1038/377539a0
- Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, et al (2010) PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10208–13. doi: 10.1073/pnas.0907011107
- Luglio HF (2014) Estrogen and body weight regulation in women: the role of estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$ ) on adipocyte lipolysis. *Acta Med Indones* 46:333–8.
- Luker KE, Lewin S a, Mihalko L a, et al (2012) Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene* 31:4750–4758. doi:

10.1038/onc.2011.633

- Luker KE, Luker GD (2006) Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett.* 238:30–41.
- Lupien M, Brown M (2009) Cistromics of hormone-dependent cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 16:381–389.
- Müller JM, Metzger E, Greschik H (2002) The transcriptional coactivator FHL2 transmits Rho signals from the cell membrane into the nucleus. *EMBO J* 21:736–748. doi: 10.1093/emboj/21.4.736
- Ma CX, Crowder RJ, Ellis MJ (2011) Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. In: *Steroids*. pp 750–752
- Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, et al (2008) Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 22:2116–27. doi: 10.1210/me.2008-0059
- Madureira P a, Varshochi R, Constantinidou D, et al (2006) The Forkhead Box M1 Protein Regulates the Transcription of the Estrogen Receptor alpha in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* 281:25167–76. doi: 10.1074/jbc.M603906200
- Maggi A (2011) Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1812:1054–1060. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.05.001
- Magnani L, Ballantyne EB, Zhang X, Lupien M (2011) PBX1 genomic pioneer function drives ER $\alpha$  signaling underlying progression in breast cancer. *PLoS Genet.* doi: 10.1371/journal.pgen.1002368
- Mahon PC, Hirota K, Semenza GL (2001) FIH-1: A novel protein that interacts with HIF-1 $\alpha$  and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* 15:2675–2686. doi: 10.1101/gad.924501
- Mahoney MC, Bevers T, Linos E, Willett WC (2008) Opportunities and strategies for breast cancer prevention through risk reduction. *CA Cancer J Clin* 58:347–371. doi: 10.3322/CA.2008.0016
- Malik S, Jiang S, Garee JP, et al (2010) Histone Deacetylase 7 and FoxA1 in Estrogen-Mediated Repression of RPRM. *Mol Cell Biol* 30:399–412. doi: 10.1128/MCB.00907-09
- Malladi S, MacAlinao DG, Jin X, et al (2016) Metastatic Latency and Immune Evasion through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* 165:45–60. doi: 10.1016/j.cell.2016.02.025
- Mallepell S, Krust A, Chambon P, Brisken C (2006) Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2196–2201. doi: 10.1073/pnas.0510974103
- Marino M, Ascenzi P (2008) Membrane association of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  influences 17 $\beta$ -estradiol-mediated cancer cell proliferation. *Steroids* 73:853–858. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.003
- Marino M, Ascenzi P, Acconcia F (2006) S-palmitoylation modulates estrogen receptor  $\alpha$  localization and functions. *Steroids* 71:298–303.
- Masri S, Phung S, Wang X, et al (2008) Genome-wide analysis of aromatase inhibitor-resistant, tamoxifen-resistant, and long-term estrogen-deprived cells reveals a role for estrogen receptor.

- Cancer Res 68:4910–4918. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0303
- Massagué J (2008) TGFβ in Cancer. *Cell* 134:215–30. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.001
- Massagué J, Obenauf AC (2016) Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* 529:298–306. doi: 10.1038/nature17038
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al (2011) HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 71:4640–4652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271–275. doi: 10.1038/20459
- McInerney EM, Rose DW, Flynn SE, et al (1998) Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12:3357–3368. doi: 10.1101/gad.12.21.3357
- McInerney EM, Tsai MJ, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1996) Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10069–73. doi: 10.1073/pnas.93.19.10069
- McIntyre E, Blackburn E, Brown PJ, et al (2010) The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 122:105–110. doi: 10.1007/s10549-009-0536-5
- Medjkane S, Perez-Sanchez C, Gaggioli C, et al (2009) Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis. *Nat Cell Biol* 11:257–268. doi: 10.1038/ncb1833
- Medunjanin S, Hermani A, De Servi B, et al (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. doi: 10.1074/jbc.M506758200
- Mérott Y, Métivier R, Penot G, et al (2004) The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor α transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *J Biol Chem* 279:26184–26191. doi: 10.1074/jbc.M402148200
- Métivier R (2001) Synergism Between ER Transactivation Function 1 (AF-1) and AF-2 Mediated by Steroid Receptor Coactivator Protein-1: Requirement for the AF-1 -Helical Core and for a Direct Interaction Between the N- and C-Terminal Domains. *Mol Endocrinol* 15:1953–1970. doi: 10.1210/me.15.11.1953
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, et al (2003) Estrogen receptor-α directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115:751–763. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00934-6
- Métivier R, Stark A, Flouriot G, et al (2002) A dynamic structural model for estrogen receptor-α activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains. *Mol Cell* 10:1019–1032. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00746-3
- Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P (1995) Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem* 270:9535–9542.

- Metzger D, Losson R, Bornert J marc, et al (1992) Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast. *Nucleic Acids Res* 20:2813–2817. doi: 10.1093/nar/20.11.2813
- Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 15:117–134.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, et al (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol- receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15:1292–1300.
- Migliaccio A, Pagano M, Auricchio F (1993) Immediate and transient stimulation of protein tyrosine phosphorylation by estradiol in MCF-7 cells. *Oncogene* 8:2183–2191.
- Migliaccio A, Rotondi A, Auricchio F (1984) Calmodulin-stimulated phosphorylation of 17 $\beta$ -estradiol receptor on tyrosine.
- 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.
- Miller TW, Pérez-Torres M, Narasanna A, et al (2009) Loss of Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 engages ErbB3 and insulin-like growth factor-I receptor signaling to promote antiestrogen resistance in breast cancer. *Cancer Res* 69:4192–4201. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0042
- Mimeault M, Batra SK (2013) Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med* 17:30–54. doi: 10.1111/jcmm.12004
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113:329–342. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00278-2
- Mishra SK, Talukder AH, Gururaj AE, et al (2004) Upstream determinants of estrogen receptor- $\alpha$  regulation of metastatic tumor antigen 3 pathway. *J Biol Chem* 279:32709–32715. doi: 10.1074/jbc.M402942200
- Moeller BJ, Richardson RA, Dewhirst MW (2007) Hypoxia and radiotherapy: Opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 26:241–248.
- Mohamed YB, Orlov YL, Velkov S, et al (2009) An oestrogen-receptor-agr-bound human chromatin interactome. *Nature*. doi: 10.1038/nature08497.An
- Mole DR, Blancher C, Copley RR, et al (2009) Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a and HIF-2a DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem* 284:16767–16775. doi: 10.1074/jbc.M901790200
- Molyneux G, Geyer FC, Magnay FA, et al (2010) BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7:403–417. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.010
- Montano MM, Müller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS (1995) The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9:814–25. doi: 10.1210/mend.9.7.7476965

- Moon HE, Cheon H, Chun KH, et al (2006) Metastasis-associated protein 1 enhances angiogenesis by stabilization of HIF-1 $\alpha$ . *Oncol Rep* 16:929–935.
- Moras D, Gronemeyer H (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 10:384–391. doi: 10.1016/S0955-0674(98)80015-X
- Moreno-Manzano V, Rodríguez-Jiménez FJ, Aceña-Bonilla JL, et al (2010) FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem* 285:1333–1342. doi: 10.1074/jbc.M109.008326
- Morine Y, Shimada M, Utsunomiya T, et al (2011) Hypoxia inducible factor expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 58:1439–1444. doi: 10.5754/hge11156
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49–53. doi: 0014-5793(96)00782-X [pii]
- Mottet D, Dumont V, Deccache Y, et al (2003) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem* 278:31277–85. doi: 10.1074/jbc.M300763200
- Murphy LC, Simon SL, Parkes A, et al (2000) Altered expression of estrogen receptor coregulators during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 60:6266–71.
- Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK (2015) The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 83. doi: 10.2147/HP.S93413
- Myers E, Fleming F, Crotty T, et al (2004) Inverse relationship between ER-beta and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer. *Br J Cancer* 91:1687–1693. doi: 10.1038/sj.bjc.6602156
- Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, et al (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 281:33095–33106. doi: 10.1074/jbc.M605058200
- Nagalingam A, Tighiouart M, Ryden L, et al (2012) Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis* 33:918–930. doi: 10.1093/carcin/bgs105
- Nathan L, Chaudhuri G (1997) Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:477–515. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.477
- Nicholson RI, Hutcheson IR, Jones HE, et al (2007) Growth factor signalling in endocrine and anti-growth factor resistant breast cancer. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8:241–253.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:5367–5374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, Martincorena I, Alexandrov LB, Martin S, Wedge DC, Van Loo P, Ju YS, Smid M, Brinkman AB, Morganella S, Aure MR, Lingjærde OC, Langerød A, Ringnér M, Ahn SM, Boyault S, Brock JE, Broeks A, SM (2016) Europe PMC Funders Group Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole genome sequences. 534:47–54. doi: 10.1038/nature17676.Landscape
- Noman MZ, Messai Y, Muret J, et al (2014) Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 7:153–160. doi: 10.1007/s12307-014-0157-3

- Olson EN, Nordheim A (2010) Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:353–65. doi: 10.1038/nrm2890
- Ooi A, Inokuchi M, Harada S, et al (2012) Gene amplification of ESR1 in breast cancers-fact or fiction? A fluorescence in situ hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification study. *J Pathol* 227:8–16. doi: 10.1002/path.3974
- Opferman JT (2016) Attacking cancer's Achilles heel: antagonism of anti-apoptotic BCL-2 family members. *FEBS J*. 2661–2675.
- Orgaz JL, Herraiz C, Sanz-Moreno V (2014) Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* 5:e983867. doi: 10.4161/sgtp.29019
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, et al (2003) Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 95:353–61. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Osborne CK, Schiff R, Fuqua SAW, Shou J (2001) Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clin Cancer Res* 7:4338s–4342s.
- Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH-F, et al (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nat Med* 17:867–74. doi: 10.1038/nm.2379
- Osmanbeyoglu HU, Lu KN, Oesterreich S, et al (2013) Estrogen represses gene expression through reconfiguring chromatin structures. *Nucleic Acids Res* 41:8061–8071. doi: 10.1093/nar/gkt586
- Oster SK, Ho CSW, Soucie EL, Penn LZ (2002) The myc oncogene: Marvelously complex. *Adv. Cancer Res*. 84:81–154.
- Otto Warburg B, Wind F, Negelein N (1923) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology. Biochem Z Biochem Z Biochem Z. Biol Chem* 309:397–519. doi: 10.1097/00000441-193107000-00022
- Padró M, Louie RJ, Lananna B V, et al (2017) Genome-independent hypoxic repression of estrogen receptor alpha in breast cancer cells. 1–16. doi: 10.1186/s12885-017-3140-9
- Padron A, Li L, Kofoed EM, Schaufele F (2007) Ligand-selective interdomain conformations of estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 21:49–61. doi: 10.1210/me.2006-0075
- Padua D, Zhang XHF, Wang Q, et al (2008) TGF $\beta$  Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell* 133:66–77. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.046
- Park J, Schwarzbauer JE (2014) Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33:1649–57. doi: 10.1038/onc.2013.118
- Park S-Y, Kim Y-J, Gao AC, et al (2006) Hypoxia increases androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Cancer Res* 66:5121–5129. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1341
- Park SJ, Kim JG, Kim ND, et al (2016) Estradiol, TGF- $\beta$ 1 and hypoxia promote breast cancer stemness and EMT-mediated breast cancer migration. *Oncol Lett* 11:1895–1902. doi: 10.3892/ol.2016.4115
- Park YM, Cho JY, Koo Y Do, Lee YJ (2009) Effects of inhibiting the proteasomal degradation of estrogen receptor alpha on estrogen receptor alpha activation under hypoxic conditions. *Biol Pharm Bull* 32:2057–60.

- Pedram A, Razandi M, Levin ER (2006) Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Mol Endocrinol* 20:1996–2009. doi: 10.1210/me.2005-0525
- Péqueux C, Raymond-Letron I, Blacher S, et al (2012) Stromal estrogen receptor- $\alpha$  promotes tumor growth by normalizing an increased angiogenesis. *Cancer Res* 72:3010–3019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3768
- Perissi V, Menini N, Cottone E, et al (2000) AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene* 19:280–8. doi: 10.1038/sj.onc.1203303
- Persad S, Dedhar S (2003) The role of integrin-linked kinase (ILK) in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 22:375–384.
- Pescador N, Villar D, Cifuentes D, et al (2010) Hypoxia promotes glycogen accumulation through hypoxia inducible factor (HIF)-mediated induction of glycogen synthase 1. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0009644
- Peters G a, Khan S a (1999) Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol* 13:286–296. doi: 10.1210/mend.13.2.0244
- Plaschka C, Nozawa K, Cramer P (2016) Mediator Architecture and RNA Polymerase II Interaction. *J Mol Biol* 428:2569–2574. doi: 10.1016/j.jmb.2016.01.028
- Platet N, Cunat S, Chalbos D, et al (2000) Unliganded and liganded estrogen receptors protect against cancer invasion via different mechanisms. *Mol Endocrinol* 14:999–1009. doi: 10.1210/mend.14.7.0492
- Poola I, Speirs V (2001) Expression of alternatively spliced estrogen receptor alpha mRNAs is increased in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78:459–469. doi: 10.1016/S0960-0760(01)00118-2
- Porta C, Paglino C, Mosca A (2014) Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol* 4:64. doi: 10.3389/fonc.2014.00064
- Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R (2002) Mutant Actins Demonstrate a Role for Unpolymerized Actin in Control of Transcription by Serum Response Factor. *Mol Biol Cell* 13:2001–2015. doi: 10.1091/mbc.02
- Poulard C, Treilleux I, Lavergne E, et al (2012) Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Mol Med* 4:1200–1213. doi: 10.1002/emmm.201201615
- Prat A, Adamo B, Cheang MCU, et al (2013) Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *Oncologist* 18:123–33. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0397
- Prat A, Parker JS, Karginova O, et al (2010) Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12:R68. doi: 10.1186/bcr2635
- Prat A, Perou CM (2011) Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5:5–23.
- Prater MD, Petit V, Alasdair Russell I, et al (2014) Mammary stem cells have myoepithelial cell properties. *Nat Cell Biol* 16:942–950. doi: 10.1038/ncb3025
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306–360. doi: 10.1210/edrv.18.3.0303
- Purcell DJ, Chauhan S, Jimenez-Stinson D, et al (2015) Novel CARM1 Interacting Protein, DZIP3, is a

- Transcriptional Coactivator of Estrogen Receptor  $\alpha$ . *Mol Endocrinol* 2015;29:1083. doi: 10.1210/me.2015-1083
- Quaedackers ME, van den Brink CE, van der Saag PT, Tertoolen LG (2007) Direct interaction between estrogen receptor  $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in the nucleus of living cells. *Mol Cell Endocrinol* 273:42–50. doi: S0303-7207(07)00185-2 [pii]\r10.1016/j.mce.2007.05.002
- Radisky DC, Bissell MJ (2007) NF- $\kappa$ B links oestrogen receptor signalling and EMT. *Nat Cell Biol* 9:361–363. doi: Doi 10.1038/Ncb0407-361
- Radovick S, Levine JE, Wolfe A (2012) Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3:
- Rajhans R, Nair S, Holden AH, et al (2007) Oncogenic potential of the nuclear receptor coregulator proline-, glutamic acid-, leucine-rich protein 1/modulator of the nongenomic actions of the estrogen receptor. *Cancer Res* 67:5505–5512. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3647
- Rapisarda A, Melillo G (2012) Overcoming disappointing results with antiangiogenic therapy by targeting hypoxia. *Nat Rev Clin Oncol* 9:1–14. doi: 10.1038/nrclinonc.2012.64
- Razandi M, Alton G, Pedram A, et al (2003) Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor  $\alpha$  at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 23:1633–46. doi: 10.1128/MCB.23.5.1633
- Razandi M, Oh P, Pedram A, et al (2002) ERs associate with and regulate the production of caveolin: implications for signaling and cellular actions. *Mol Endocrinol* 16:100–115. doi: 10.1210/me.16.1.100
- Reese JM, Suman VJ, Subramaniam M, et al (2014) ER $\beta$ 1: characterization, prognosis, and evaluation of treatment strategies in ER $\alpha$ -positive and -negative breast cancer. *BMC Cancer* 14:749. doi: 10.1186/1471-2407-14-749
- Revankar CM (2005) A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science (80- )* 307:1625–1630. doi: 10.1126/science.1106943
- Rey S, Semenza GL (2010) Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 86:236–242.
- Reyes D, Ballaré C, Castellano G, et al (2014) Activation of mitogen- and stress-activated kinase 1 is required for proliferation of breast cancer cells in response to estrogens or progestins. *Oncogene* 33:1570–80. doi: 10.1038/onc.2013.95
- Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, et al (2017) Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. *Nature* 547:55–60. doi: 10.1038/nature22992
- Robinson DR, Wu Y-M, Vats P, et al (2013) Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 45:1446–51. doi: 10.1038/ng.2823
- Rochefort H, Platet N, Hayashido Y, et al (1998) Estrogen receptor mediated inhibition of cancer cell invasion and motility: an overview. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:163–8.
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ (1999) Potentiation of human estrogen receptor  $\alpha$  transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274:22296–22302. doi: 10.1074/jbc.274.32.22296



- Roger P, Sahla ME, Makela S, et al (2001) Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 61:2537–2541.
- Ropero AB, Alonso-Magdalena P, Quesada I, Nadal A (2008) The role of estrogen receptors in the control of energy and glucose homeostasis. *Steroids* 73:874–879. doi: 10.1016/j.steroids.2007.12.018
- Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, et al (2012) Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 481:389. doi: 10.1038/nature10730
- Russo J, Tay LK, Russo IH (1982) Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 2:5–73.
- Ryu K, Park C, Lee Y (2011) Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogen receptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407:831–836. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.119
- Safe S (2001) Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm* 62:231–252. doi: 10.1016/S0083-6729(01)62006-5
- Saha Roy S, Vadlamudi RK (2012) Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis. *Int J Breast Cancer* 2012:1–8. doi: 10.1155/2012/654698
- Sánchez-Martín L, Sánchez-Mateos P, Cabañas C (2013) CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol. Med.* 19:12–22.
- Sang N, Stiehl DP, Bohensky J, et al (2003) MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem* 278:14013–14019. doi: 10.1074/jbc.M209702200
- Santen RJ, Song RX, Zhang Z, et al (2005) Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity. In: *Endocrine-Related Cancer*.
- Sati S, Cavalli G (2017) Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma* 126:33–44.
- Schacter JL, Henson ES, Gibson SB (2014) Estrogen regulation of anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 expression in breast cancer cells. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0100364
- Scharenberg MA, Chiquet-Ehrismann R, Asparuhova MB (2010) Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42:1911–1914.
- Schito L, Semenza GL (2016) Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer* 2:758–770.
- Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, et al (2011) High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by CHIP-seq. *Blood*. doi: 10.1182/blood-2010-10-314427
- Schwabe JW, Neuhaus D, Rhodes D (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 348:458–61. doi: 10.1038/348458a0
- Semenza GL (2010a) Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29:625–34. doi: 10.1038/onc.2009.441
- Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148:399–408.

- Semenza GL (2010b) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20:51–56.
- Semenza GL (2016) The hypoxic tumor microenvironment: A driving force for breast cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863:382–391.
- Sentis S, Le Romancer M, Bianchin C, et al (2005) Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 19:2671–2684. doi: 10.1210/me.2005-0042
- Settleman J (2003) A nuclear MAL-function links Rho to SRF. *Mol. Cell* 11:1121–1123.
- 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* 29:237–55. doi: 10.1081/ERC-120022321
- Shu XO, Jin F, Dai Q, et al (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:483–488.
- Sihto H, Lundin J, Lundin M, et al (2011) Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. *Breast Cancer Res* 13:R87. doi: 10.1186/bcr2944
- Singletary SE (2003) Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg* 237:474–82. doi: 10.1097/01.SLA.0000059969.64262.87
- Skibinski A, Kuperwasser C (2015) The origin of breast tumor heterogeneity. *Oncogene* 34:5309–5316. doi: 10.1038/onc.2014.475
- Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, et al (2005) CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 8:R7. doi: 10.1186/bcr1371
- Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW (1997) Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11:657–666. doi: 10.1210/me.11.6.657
- Song Z, Liu Z, Sun J, et al (2016) The MRTF-A/B function as oncogenes in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 35:127–138. doi: 10.3892/or.2015.4329
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98:159–69. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81011-9
- Span PN, Bussink J (2015) Biology of hypoxia. *Semin Nucl Med* 45:101–109. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2014.10.002
- Spicuglia S, Vanhille L (2012) Chromatin signatures of active enhancers. *Nucleus* 3:126–31. doi: 10.4161/nucl.19232
- Stegeman H, Kaanders JH, Wheeler DL, et al (2012) Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC Cancer* 12:463. doi: 10.1186/1471-2407-12-463
- Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, et al (1991) A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *J Am Med Assoc* 265:1985–1990. doi: 10.1001/jama.1991.03460150089030

- Stender JD, Kim K, Charn TH, et al (2010) Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol* 30:3943–3955. doi: 10.1128/MCB.00118-10
- Stender JD, Stossi F, Funk CC, et al (2011) The Estrogen-Regulated Transcription Factor PITX1 Coordinates Gene-Specific Regulation by Estrogen Receptor-Alpha in Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 25:1699–1709. doi: 10.1210/me.2011-0102
- Stiehl DP, Bordoli MR, Abreu-Rodríguez I, et al (2011) Non-canonical HIF-2 $\alpha$  function drives autonomous breast cancer cell growth via an AREG-EGFR/ErbB4 autocrine loop. *Oncogene* 31:2283–2297. doi: 10.1038/onc.2011.417
- Stoner M (2002) Hypoxia Induces Proteasome-Dependent Degradation of Estrogen Receptor alpha in ZR-75 Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 16:2231–2242. doi: 10.1210/me.2001-0347
- Stossi F, Likhite VS, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2006) Estrogen-occupied estrogen receptor represses cyclin G2 gene expression and recruits a repressor complex at the cyclin G2 promoter. *J Biol Chem* 281:16272–16278. doi: 10.1074/jbc.M513405200
- Ström A, Hartman J, Foster JS, et al (2004) Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1566–71. doi: 10.1073/pnas.0308319100
- Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, et al (2008) Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell* 30:336–47. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.022
- Surmacz E (2000) Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5:95–105.
- Svejstrup JQ, Vichi P, Egly JM (1996) The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH. *Trends Biochem. Sci.* 21:346–350.
- Szego CM, Davis JS (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:1711–8. doi: 10.1073/pnas.58.4.1711
- Tan SK, Lin ZH, Chang CW, et al (2011) AP-2 $\gamma$  regulates oestrogen receptor-mediated long-range chromatin interaction and gene transcription. *EMBO J* 30:2569–81. doi: 10.1038/emboj.2011.151
- Tanos T, Rojo LJ, Echeverria P, Briskin C (2012) ER and PR signaling nodes during mammary gland development. *Breast Cancer Res* 14:210. doi: 10.1186/bcr3166
- Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al (2010) Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15449–15454. doi: 10.1073/pnas.1004900107
- Thomas C, Gustafsson J-Å (2015) Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 26:467–476. doi: 10.1016/j.tem.2015.06.007
- Thomas H V., Reeves GK, Key TJA (1997) Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: A quantitative review. *Cancer Causes Control* 8:922–928. doi: 10.1023/A:1018476631561
- Tjian R, Maniatis T (1994) Transcriptional activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77:5–8. doi: 10.1016/0092-8674(94)90227-5
- Tkocz D, Crawford NT, Buckley NE, et al (2012) BRCA1 and GATA3 corepress FOXC1 to inhibit the

- pathogenesis of basal-like breast cancers. *Oncogene* 31:3667–3678. doi: 10.1038/onc.2011.531
- Toft DJ, Cryns VL (2011) Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies. *Mol Endocrinol* 25:199–211. doi: 10.1210/me.2010-0164
- Tomasetti C, Vogelstein B, Dubal PM, et al (2015) Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347:78–81. doi: 10.1126/science.1260825
- Tong J, Li L, Ballermann B, Wang Z (2016) Phosphorylation and activation of RhoA by ERK in response to epidermal growth factor stimulation. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0147103
- Toy W, Shen Y, Won H, et al (2013) ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 45:1439–45. doi: 10.1038/ng.2822
- Treen AK, Luo V, Chalmers JA, et al (2016) Divergent regulation of ER and Kiss genes by 17 $\beta$ -estradiol in hypothalamic ARC versus AVPV models. *Mol Endocrinol* 30:me.2015-1189. doi: 10.1210/me.2015-1189
- Trock BJ, Leena HC, Clarke R (2006) Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98:459–471. doi: 10.1093/jnci/djj102
- Tryfonidis K, Zardavas D, Katzenellenbogen BS, Piccart M (2016) Endocrine treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond. *Cancer Treat. Rev.* 50:68–81.
- Tsai YP, Wu KJ (2014) Epigenetic regulation of hypoxia-responsive gene expression: Focusing on chromatin and DNA modifications. *Int. J. Cancer* 134:249–256.
- Tsutsumi A, Okada H, Nakamoto T, et al (2011) Estrogen induces stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) production in human endometrial stromal cells: A possible role of endometrial epithelial cell growth. *Fertil Steril* 95:444–447. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.08.037
- Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, et al (2004) Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 279:14871–8. doi: 10.1074/jbc.M400461200
- Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, et al (1994) Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem* 269:16433–16442.
- Vander Heiden M, Cantley L, Thompson C (2009) Understanding the Warburg effect: The metabolic Requirements of cell proliferation. *Science* (80- ) 324:1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.Understanding
- Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Treisman R (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316:1749–52. doi: 10.1126/science.1141084
- Viale G (2012) The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*. doi: 10.1093/annonc/mds326
- Vicent GP, Ballaré C, Nacht AS, et al (2006) Induction of Progesterone Target Genes Requires Activation of Erk and Msk Kinases and Phosphorylation of Histone H3. *Mol Cell* 24:367–381. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.011
- Voutsadakis IA (2016) Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by

- Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation. *J Clin Med* 5:11. doi: 10.3390/jcm5010011
- Walker P, Germond JE, Brown-Luedi M, et al (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. doi: 10.1093/nar/12.22.8611
- Wang Q, Sharma D, Ren Y, Fondell JD (2002) A coregulatory role for the TRAP-Mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* 277:42852–42858. doi: 10.1074/jbc.M206061200
- Wang W, Goswami S, Lapidus K, et al (2004) Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. *Cancer Res* 64:8585–8594. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1136
- Wang X, Belguise K, Kersual N, et al (2007) Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol* 9:470–8. doi: 10.1038/ncb1559
- Warburg O (1956) Injuring of Respiration the Origin of Cancer Cells. *Science* (80- ) 123:309–14. doi: 10.1126/science.123.3191.309
- Ward RD, Weigel NL (2009) Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *BioFactors* 35:528–536.
- Wärnmarkt A, Almlöf T, Leers J, et al (2001) Differential Recruitment of the Mammalian Mediator Subunit TRAP220 by Estrogen Receptors ER?? and ER?? *J Biol Chem* 276:23397–23404. doi: 10.1074/jbc.M011651200
- Watson PH, Pon RT, Shiu RPC (1991) Inhibition of c-myc Expression by Phosphorothioate Antisense Oligonucleotide Identifies a Critical Role for c-myc in the Growth of Human Breast Cancer. *Cancer Res* 51:3996–4000.
- Weis KE, Ekena K, Thomas J a, et al (1996) Constitutively active human estrogen receptors containing amino acid substitutions for tyrosine 537 in the receptor protein. *Mol Endocrinol* 10:1388–98. doi: 10.1210/mend.10.11.8923465
- White R, Sjöberg M, Kalkhoven E, Parker MG (1997) Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J* 16:1427–1435. doi: 10.1093/emboj/16.6.1427
- Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, et al (2004) Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 64:3807–3813. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3852
- Williams C, Edvardsson K, Lewandowski S a, et al (2008) A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* 27:1019–1032. doi: 10.1038/sj.onc.1210712
- Wilson C, Qiu L, Hong Y, et al (2017) The histone demethylase KDM4B regulates peritoneal seeding of ovarian cancer. *Oncogene* 36:2565–2576. doi: 10.1038/onc.2016.412
- Wolff AC, Lazar AA, Bondarenko I, et al (2013) Randomized phase III placebo-controlled trial of letrozole plus oral temsirolimus as first-line endocrine therapy in postmenopausal women with locally advanced or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 31:195–202. doi: 10.1200/JCO.2011.38.3331

- Wu AH, Wan P, Hankin J, et al (2002) Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 23:1491–1496. doi: 10.1093/carcin/23.9.1491
- Wu MZ, Chen SF, Nieh S, et al (2015) Hypoxia drives breast tumor malignancy through a TET-TNF $\alpha$ -p38-MAPK signaling axis. *Cancer Res* 75:3912–3924. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3208
- Xie J, Xiao Y, Zhu X yan, et al (2016) Hypoxia regulates stemness of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Med Oncol*. doi: 10.1007/s12032-016-0755-7
- Xu W, Xu H, Fang M, et al (2017) MKL1 links epigenetic activation of MMP2 to ovarian cancer cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.006
- Yager JD, Liehr JG (1996) Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:203–232. doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.001223
- Yang J, Altahan A, Jones DT, et al (2015) Estrogen receptor- $\alpha$  directly regulates the hypoxia-inducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:15172–7. doi: 10.1073/pnas.1422015112
- Yang J, Jubb AM, Pike L, et al (2010) The histone demethylase JMJD2B is regulated by estrogen receptor  $\alpha$  and hypoxia, and is a key mediator of estrogen induced growth. *Cancer Res* 70:6456–6466. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0413
- Ye X, Tam WL, Shibue T, et al (2015) Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* 525:256–260. doi: 10.1038/nature14897
- Ye Y, Xiao Y, Wang W, et al (2010) ER $\alpha$  signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. *Oncogene* 29:1451–1462. doi: 10.1038/onc.2009.433
- Yi JM, Kwon HY, Cho JY, Lee YJ (2009) Estrogen and hypoxia regulate estrogen receptor alpha in a synergistic manner. *Biochem Biophys Res Commun* 378:842–846. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.142
- Yi P, Driscoll MD, Huang J, et al (2002) The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta. *Mol Endocrinol* 16:674–693. doi: 10.1210/mend.16.4.0810
- Yin J wen, Liang Y, Park JY, et al (2012) Mediator MED23 plays opposing roles in directing smooth muscle cell and adipocyte differentiation. *Genes Dev* 26:2192–2205. doi: 10.1101/gad.192666.112
- Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, et al (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J* 11:3681–94.
- Yu X, Zhang X, Dhakal IB, et al (2012) Induction of cell proliferation and survival genes by estradiol-repressed microRNAs in breast cancer cells. *BMC Cancer* 12:29. doi: 10.1186/1471-2407-12-29
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, et al (2006) Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest* 86:1221–1232. doi: 10.1038/labinvest.3700482
- Zhang D, Jiang P, Xu Q, Zhang X (2011a) Arginine and glutamate-rich 1 (ARGLU1) interacts with mediator subunit 1 (MED1) and is required for estrogen receptor-mediated gene transcription and breast cancer cell growth. *J Biol Chem* 286:17746–17754. doi: 10.1074/jbc.M110.206029

- Zhang L, Cui J, Leonard M, et al (2013) Silencing MED1 Sensitizes Breast Cancer Cells to Pure Anti-Estrogen Fulvestrant In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0070641
- Zhang QX, Borg Å, Wolf DM, et al (1997) An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res* 57:1244–1249.
- Zhang SM, Lee I-M, Manson JE, et al (2007) Alcohol consumption and breast cancer risk in the Women's Health Study. *Am J Epidemiol* 165:667–76. doi: 10.1093/aje/kwk054
- Zhang X, Krutchinsky A, Fukuda A, et al (2005) MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell* 19:89–100. doi: 10.1016/j.molcel.2005.05.015
- Zhang X, Wang Z-Y (2013) Estrogen receptor-alpha variant, ER-alpha36, is involved in tamoxifen resistance and estrogen hypersensitivity. *Endocrinology* 154:1990–1998. doi: 10.1210/en.2013-1116
- Zhang Y, Moerkens M, Ramaiahgari S, et al (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. doi: 10.1186/bcr2883
- Zhao Y, Zhang K, Giesy JP, Hu J (2015) Families of nuclear receptors in vertebrate models: characteristic and comparative toxicological perspective. *Sci Rep* 5:8554. doi: 10.1038/srep08554
- Zheng S-S, Chen X-H, Yin X, Zhang B-H (2013) Prognostic significance of HIF-1 $\alpha$  expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 8:e65753. doi: 10.1371/journal.pone.0065753
- Zhou Y, Ming J, Xu Y, et al (2015) ER $\beta$ 1 inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through upregulation of E-cadherin in a Id1-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 457:141–147. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.038
- Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, et al (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391–396. doi: 10.1101/GAD.14.4.391
- Zwart W, Theodorou V, Kok M, et al (2011) Oestrogen receptor-co-factor-chromatin specificity in the transcriptional regulation of breast cancer. *EMBO J* 30:4764–4776. doi: 10.1038/emboj.2011.368