

Étude des relations fonctionnelles entre le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur ER α 36 dans le cancer du sein

Henri-Philippe Konan

► To cite this version:

Henri-Philippe Konan. Étude des relations fonctionnelles entre le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur ER α 36 dans le cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1327 . tel-02506651

HAL Id: tel-02506651 https://theses.hal.science/tel-02506651

Submitted on 12 Mar 2020 $\,$

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.



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1327

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale 340 Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (ED BMIC)

Spécialité de doctorat : *Cancérologie* **Discipline** : *Biologie moléculaire et cellulaire*

Soutenue publiquement le 13/12/2019, par :

Henri-Philippe KONAN

Etude des relations fonctionnelles entre le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur ERα36 dans le cancer du sein

Devant le jury composé de :

- Pr. Laurent MOREL, Professeur des Universités, Clermont-Ferrand
- Dr. Hichem MERTANI, Maître de conférences, UCBL1, Lyon
- Dr. Françoise LENFANT, Directrice de Recherche, INSERM, Toulouse
- Dr. Hélène DUMOND, Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy
- Dr. Muriel LE ROMANCER, Directrice de Recherche, INSERM, Directrice de thèse, Lyon

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLEE
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est-Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud-	Doyenne : Mme C. BURILLON
Charles Mérieux	
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR-Faculté des Sciences	Administrateur Provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronio	que Directeur : M. Bernard BIGOT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements

Je remercie dans un premier temps le **Pr. Alain Puisieux**, ancien Directeur du CRCL, de m'avoir accueilli dans cette unité où j'ai passé plus de 4 ans. J'ai particulièrement apprécié nos petits échanges soit dans la cour, dans l'ascenseur ou encore lors des parties de foot au cours des retraites de département. Votre sympathie va me manquer. Je remercie tous les membres du CRCL pour les moments passés ensembles.

Je remercie l'Ambassade de Côte d'Ivoire en France et la Présidence de la Côte d'ivoire qui ont financé cette thèse.

Je remercie infiniment **Dr. Françoise Lenfant** et **Pr. Laurent Morel** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs et de faire le déplacement à Lyon pour ma soutenance. **Dr. Hichem Mertani**, merci de me faire l'honneur d'être dans ce jury de thèse. Merci infiniment pour tes précieux conseils et ta bienveillance.

Dr. Hélène Dumond, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon CST et d'être examinatrice de ma thèse. Merci pour toute ton aide apportée à mon projet à travers tes conseils et le matériel que tu m'as gentiment fait parvenir de Nancy. J'espère que tu as pu apprécier les bonnes brioches aux pralines de la région. Un grand merci au **Dr. Jean-Marc Vanacker** qui a participé à mon CST. Merci pour tous tes conseils lors de ces séances et pour ta disponibilité.

A **Muriel** ma Directrice de thèse. Je ne saurais comment te remercier de m'avoir accueilli dans ton équipe. Ton dynamisme, ton efficacité et ta détermination sont des choses que j'ai rarement vues dans mon entourage. Merci de m'avoir fait confiance dès le début. Le projet ER36 a été (est) très difficile mais tu n'as pas arrêté de chercher des moyens d'y parvenir au bout. Je me souviens du printemps 2016 quand j'étais en pleine rédaction de mon stage de M2. Le labo était fermé pour cause d'incendie mais tu m'as quand même invité chez toi pour travailler ensemble sur mon manuscrit afin d'augmenter mes chances d'être sélectionné pour le concours BMIC. Je te suis infiniment reconnaissant pour ce geste ainsi que les nombreux autres que tu as eu au cours de ma thèse. Ta sympathie et ton leadership sont également de très rares qualités. Cela a été un grand plaisir et une réelle chance de t'avoir comme chef. Merci infiniment pour tout et félicitations pour ce prix Ruban rose que tu mérites amplement.

Laura, merci de m'avoir accueilli en tant qu'ancienne chef d'équipe. Merci pour tes conseils et tes encouragements dans les moments où j'avais des coups de mou. Je te souhaite une bonne retraite.

Coralie, mon cœur se remplit de joie quand j'écris ton nom à cet instant. Ton retour au labo a été un nouveau souffle pour moi et ma thèse. Je suis vraiment très heureux d'avoir travaillé avec toi pendant cette dernière année. Tu m'as communiqué ta rigueur, ton optimisme et ta détermination ainsi que ta capacité à surmonter les obstacles. Merci pour ton aide si précieuse dans tous les domaines et particulièrement pour boucler les derniers résultats et le papier. Je suis très fier de t'avoir eu comme mentor.

Tu as amplement mérité d'avoir ce poste de chercheur. Je te souhaite beaucoup de succès à venir. Pour l'heureux évènement que tu attends, que la Grâce de Dieu soit ton partage.

Lucie, je te remercie infiniment pour ces 4 années passées ensembles. Tu as été une collègue formidable. Merci pour toutes les fois où tu passais me voir à mon bureau prendre des nouvelles quand tu sentais que je n'allais pas bien. Merci également pour tous tes conseils scientifiques et humains. Je suis très fier d'avoir participé à ta brillante soutenance de thèse. Tu as été une source d'inspiration pour moi en de nombreux points. Si je m'améliore en design de powerpoint et en présentation orale, c'est en partie grâce à toi. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite de ta carrière. Merci également à Rémi. Tu es une personne très sympathique que j'ai eu la chance de rencontrer.

Julien, a.k.a Mister « PLA specialist ». Je te remercie infiniment pour tous tes conseils humains et scientifiques. Tu n'hésites jamais à aider lorsque l'on te demande. Merci de m'avoir formé dans plusieurs domaines. Merci de ta gentillesse et de tout ce que tu as fait pour moi. J'ai eu la chance de rencontrer le merveilleux petit Valentin. Je vous souhaite beaucoup de bonheur tous les 3 avec Laetis. Au plaisir de se revoir...

Hubert, merci pour toutes ces fois où tu me charriais avec les défaites du PSG \bigcirc , merci pour ta grande gentillesse et ton humour. Je n'oublie pas le sanglier que tu m'avais apporté qui était excellent. Merci pour tout.

Chang, merci pour ton calme et ta bonne humeur. Tu incarnes la sagesse et la sérénité. Cela a été un immense plaisir de t'avoir au labo.

Ausra, merci pour ta précieuse aide au cours de ce projet ainsi que ta gentillesse. J'ai été ravi de te rencontrer et d'échanger avec toi lors des pauses du midi. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ton merveilleux Viggo.

Cécile et Farida, pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre générosité. Je vous témoigne toute ma gratitude. Je suis très heureux de vous côtoyer au quotidien. Merci pour toute votre aide. Cela a été plus qu'un plaisir de travailler avec vous.

Diana, a.k.a « Lady Di ». Tu es une magnifique personne. De toi je retiens ces choses : gentillesse, amour, générosité et rigueur scientifique. Tes connaissances en métabolisme m'impressionnent. Nous avons passé plus de 3 belles années ensemble. Qu'importe les petits accrochages, je retiens que le meilleur de toi. Je me souviens du Halawat el jbn que tu m'as fait pour mon anniversaire. Je tiens à te témoigner toute ma gratitude. Je te souhaite une excellente carrière après ce doctorat qu'on va soutenir à 2 jours près. **Razan**, merci pour tout : ton humour, ta gentillesse. Je te souhaite également beaucoup de réussite.

A mes petites **Lara et Ha**. Vous êtes trop mignonnes toutes les deux. Vous allez me manquer. Je vous souhaite beaucoup de réussite. Ha, je sais que tu es beaucoup stressée mais accroche toi, tu es une personne courageuse et travailleuse, je ne me fais pas de soucis pour toi. **Yakun**, ta générosité, ta patience et ta gentillesse m'ont beaucoup touché. Je suis très chanceux d'avoir côtoyé une personne au grand cœur comme toi. **Raana, a.k.a « the lab esthetician »**. J'ai appris à connaître une personne formidable. Tu es devenue une grande amie et j'en suis très chanceux. Merci pour tout. Par la même occasion j'envoie une grosse bise au géant du tennis Pierre-Yves.

A ma petite **Léa, a.k.a « la jabbourisation** ». Merci de ton amitié et pour tous nos déjeuners les mercredis. Pour la suite de ta thèse je te souhaite beaucoup de courage.

A mon ami **Matthias**. Je suis très reconnaissant de t'avoir rencontré entre ces murs du CRCL. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble. J'admire ton ouverture d'esprit, ton excellence scientifique et ta qualité de passe au foot. Félicitations encore pour ta thèse, je te souhaite beaucoup de succès.

Remerciement spécial pour une très grande amie : **Kawtar**. Je ne sais comment te témoigner de mon immense reconnaissance pour tout ce que tu m'as apporté. Les mots ne suffiront pas pour exprimer toute la gratitude que j'ai pour toi. Tu as été présente dans les bons comme les mauvais moments. Merci pour toutes tes attentions, ton soutien et ton aide à mon égard. Je te souhaite beaucoup, beaucoup de succès pour la suite. J'espère qu'on aura l'occasion de se manger un bon couscous bientôt ©

Je remercie le **Dr. Véronique Maguer-Satta** ainsi que tous les membres de son équipe avec qui on a pu passer de bons moments. Je remercie particulièrement **Nora, Mario, Kévin, Sylvain,** *Sandrine, Thibault, Florence.*

Je remercie le Dr. Stéphane Ansieau. Merci pour ton aide technique à la réalisation des lignées T47D stables. Merci également pour ta sympathie et ta bonne humeur.

Céline K. Tu es une des rares personnes à avoir une telle bonne humeur et ce positivisme. Merci pour tous tes conseils, tes encouragements et pour ces pauses café passées ensemble. Tu as été à la fois une maman et une sœur pour moi et je ne l'oublierai jamais. Merci infiniment pour tout.

Je tiens à remercier tous les membres de ma famille. **Maman**, tu as fait d'énormes sacrifices et de nombreuses prières pour que je sois là où je me trouve en ce moment. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout. J'ai hâte de te voir et j'espère te rendre encore fier lors de ma soutenance. Merci infiniment pour tout. Merci à toi **papa** pour tout ce que tu as fait, tes sacrifices, ton engagement et tes précieux conseils. Je te suis infiniment reconnaissant.

A mes frères et sœurs : **Aurélia, Line, Lionel, Annso et Virginie**. Je vous aime et vous remercie d'être toujours là pour moi. Bien que nous soyons tous dans des pays différents, votre soutien reste inconditionnel. J'ai hâte de vous voir bientôt.

A mes tatas **Adeline, Clémentine et Juliette** et mes tontons **Sylvestre et Quique**. Je vous dédis ce travail et vous remercie pour votre amour, votre soutien et vos encouragements. A mes grand-mères **Elisabeth (a.k.a Moh Kangah) et Gisèle**. Vous me manquez énormément. J'espère avoir l'occasion de passer vous voir et vous raconter un peu ce que je deviens. A mon grand-père **Maurice**, parti beaucoup trop tôt, j'espère que de là où tu es tu es fier de moi. A toi ma cousine et grande sœur **Christelle**, je te dédis ce travail. A **Jean-Michel et Maryse**. Je ne pourrais pas ne pas vous citer. Pour toutes les fois où vous m'avez apporté amour, soutien, amitié ; pour tous ces merveilleux séjours que vous m'avez permis de passer dans le paisible village de Praténou, je vous sais gré. Un grand merci aux bretons : **Mélanie, Matthieu** (mon grand rival lyonnais), **Isa**. Merci à **Elise Daniel** ma petite nièce que j'aime tant. J'ai hâte de te serrer dans mes bras.

A mes amis **Abdel, Moussa, Ana** : merci pour votre soutien et tous les moments passés ensembles qui m'ont permis d'oublier un peu les difficultés du doctorat. J'ai hâte de vous voir à ma soutenance et de trinquer avec vous.

Enfin, mes derniers remerciements vont à une personne exceptionnelle. A toi **Laurianne** qui a été présente pour moi dans TOUS les moments. Je ne saurai comment te remercier. Je pourrai même écrire une thèse pour te remercier pour tout ce que tu m'as apporté mais tu sais déjà tout. Si j'ai réussi à franchir les nombreux obstacles rencontrés au cours de ma thèse, c'est en grande partie grâce à toi. Ta patience, ton amour et ta bonté m'ont beaucoup réconforté. Je te dédis ce travail et j'espère que tu es fier de moi. Merci infiniment pour ton grand cœur, tu as toute ma gratitude.

Caractéristiques générales

Titre

Etude des relations fonctionnelles entre le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur ER α 36 dans le cancer du sein

Mots-clés

ER α 36, PR, biomarqueur, signalisation, activité transcriptionnelle, Cancer du sein.

Résumé

Le cancer du sein est le cancer le plus diagnostiqué chez la femme et son développement se fait le plus souvent via l'action des hormones stéroïdes ovariennes : les œstrogènes et la progestérone. Ces deux hormones agissent par l'intermédiaire de leurs récepteurs respectifs : ERa et PR, qui sont des biomarqueurs clés de la progression tumorale. Plus de 75% des tumeurs mammaires expriment ER α au diagnostic. Il y a quelques années, une isoforme d'ERa : ERa36 a été identifiée. ERa36 est une protéine de 36 kDa exprimée indépendamment d'ERa, et qui possède un fort potentiel prolifératif et métastatique dans le cancer du sein. Nous avons étudié son expression ainsi que sa valeur pronostique dans une cohorte de tumeurs mammaires ainsi que dans des sous-catégories de cette cohorte. De manière intéressante, le mauvais pronostic d'ERa36 était retrouvé uniquement dans la sous-catégorie PR-positive et non dans la sous-catégorie PR-négative, suggérant que ERa36 pourrait interférer avec la signalisation de PR. Pour la première fois, nous avons identifié un lien fonctionnel entre ERa36 et PR. En effet, nous avons montré d'une part que ERa36 interagit avec PR dans le noyau de cellules cancéreuses et d'autre part que ERa36 agit comme un corégulateur de l'activité transcriptionnelle de PR. De plus, ERa36 régule l'effet antiprolifératif de la progestérone. Ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives au rôle joué par ER α 36 dans la signalisation de la progestérone dans le cancer du sein.

General features

Title

Functional relationships between the Progesterone Receptor (PR) and ER α 36 in breast cancer

Keywords

ERa36, PR, biomarker, signaling, transcriptional activity, breast cancer.

Abstract

Breast cancer is the most diagnosed cancer in women and its development is most often induced *via* the action of ovarian steroid hormones : estrogen and progesterone. Both hormones act through their respective receptors : ER α and PR, which are key biomarkers of tumor progression. More than 75% of breast tumors express ER α at diagnosis. A few years ago, an isoform of ER α : ER α 36 was identified. ER α 36 is a 36 kDa protein expressed independently of ER α , which has a high proliferative and metastatic potential in breast cancer. We studied its expression as well as its prognostic value in a cohort of breast tumors and in subcategories of this cohort. Interestingly, the poor prognosis of ER α 36 was found only in the PR-positive subcategory and not in the PR-negative subcategory, suggesting that ER α 36 might interfere with PR signaling. For the first time, we identified a functional link between ER α 36 and PR. Indeed, we have shown on the one hand that ER α 36 interacts with PR in the nucleus of cancer cells, and on the other hand that ER α 36 acts as a coregulator of the transcriptional activity of PR. In addition, ER α 36 regulates the antiproliferative effect of progesterone. This work opens up new perspectives on the role played by ER α 36 in the progesterone signaling in breast cancer.

Laboratoire

Signalisation des hormones stéroïdiennes et cancer du sein Equipe Muriel LE ROMANCER, Cheney D, 4^{ème} étage Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon CNRS/UMR 5286- INSERM U1052 28 Rue Laennec, 69008 Lyon France

Financements

Ambassade de la République de Côte d'Ivoire en France Présidence de la République de Côte d'Ivoire

Communications scientifiques

- 9th French Nuclear Receptors Meeting, Lille, Septembre 2019- Présentation orale
- 5th Scientific Day of the CRCL, Lyon, Juin 2018- Présentation orale
- Cancéropôle CLARA meeting, Lyon, Avril 2018- Poster
- 3rd Course on breast cancer, Paris, Juin 2017- Poster

Publication

Article : Henri-Philippe Konan, Loay Kassem, Soleilmane Omarjee, Ausra Surmieliova-Garnès, Julien Jacquemetton, Elodie Cascales, Amélie Rezza, Olivier Trédan, Isabelle Treilleux, Coralie Poulard and Muriel Le Romancer. ERα-36 regulates progesterone receptor activity in breast cancer.

Submitted to Cancers

Table des matières

Car	acto	éristiques générales	5
List	e d	es abréviations	12
List	e d	es figures	15
List	e d	es tableaux	16
Ava	nt-	propos	17
Int	odu	uction	18
Cha	pit	re 1 : Généralités sur le cancer du sein	19
I-	In	cidence	19
II-	0	rigines du cancer du sein	20
1	.)	Facteurs génétiques	21
2	2)	Facteurs hormonaux	21
3	;)	Facteurs environnementaux	22
	a)	Radiations ionisantes	22
	b)	Risques liés à l'obésité	22
	c)	Activité physique et réduction du risque	23
	d)	Tabac et alcool	23
4	.)	Les cellules souches cancéreuses	23
III-		Anatomie de la glande mammaire	24
1	.)	Le compartiment épithélial	25
2	2)	Le compartiment mésenchymateux	27
IV-		Pathologie du cancer du sein	27
1	.)	Critères histologiques	28
2	2)	Critères anatomopathologiques	29
	a)	Le stade TNM	29
	b)	Le grade histopronostique de Scarff, Bloom et Richardson (SBR)	31
З	;)	Critères moléculaires	32
	a)	Les récepteurs aux œstrogènes (ER)	32
	b)	Le récepteur à la progestérone (PR)	33
	c)	Le récepteur HER2	33
	d)	Ki67	33
4	.)	Classification selon l'expression des marqueurs moléculaires	34
5	5)	Les traitements du cancer du sein	36
	a)	La chirurgie	36

	b)	La radiothérapie	36
	c)	La chimiothérapie	37
	d)	L'hormonothérapie	37
	e)	Les anticorps monoclonaux humanisés	38
	f)	Les ADCs (Antibody Drug Conjugated)	38
Cha	pitre	2 : les récepteurs aux œstrogènes	40
I-	Les	æstrogènes	40
1) В	iosynthèse et métabolisme des œstrogènes	40
2) L	e cycle hormonal	42
3) Р	hysiologie des æstrogènes	.44
II-	Les	récepteurs aux œstrogènes	45
1) S	tructure	45
	a)	Structure génique	45
	b)	Structure protéique	47
2) L	es isoformes des récepteurs aux œstrogènes	. 49
111-	Ν	1ode d'action des récepteurs aux œstrogènes	51
1) L	a voie génomique	52
	a)	La voie génomique directe	52
	b)	La voie génomique indirecte	54
	c)	La voie indépendante des œstrogènes	55
2) L	a voie non génomique	56
IV-	L	es modifications post-traductionnelles des ERs	57
1) Е	xemples de PTM qui régulent les voies génomiques d'ERα	59
	a)	Phosphorylation	59
	b)	Acétylation	60
	c)	Ubiquitination	60
	d)	SUMOylation	61
	e)	Méthylation	61
2) Е	xemples de PTM qui régulent les voies non génomiques d'ERα	61
Cha	pitre	3 : ERα36	63
I-	Stru	icture et organisation d'ERα36	63
1) S	tructure chromosomique	63
2) S	tructure protéique	64
3) R	égulation de l'expression d'ERα36	65
	a)	Régulation du promoteur	65
	b)	Protéines corégulatrices de l'expression d'ERα36	66

	c)	Régulation épigénétique d'ERα36	. 67
II-	Lo	calisation cellulaire	. 67
1)	Myristoylation d'ERα36	. 68
2)	Interaction avec GP96	. 68
3)	Export nucléaire d'ERα36	. 69
III-		Voies de signalisation	. 69
1)	La voie MAPK/ERK	. 70
2)	La voie Src	. 71
3)	Relations fonctionnelles avec EGFR	. 71
4)	Activation des facteurs de l'EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition)	. 72
5)	La voie SphK1/S1P	. 72
IV-		ERα36 et cancers	. 73
1)	ERα36 dans le cancer du sein	. 73
	a)	ERα36 et cancers du sein ERα-positifs	. 73
	b)	ERα36 et cancers du sein ERα-négatifs	. 74
2)	ERα36 et cancers pulmonaires	. 75
3)	ERα36 et cancers gastriques	. 76
4)	ERα36 et cancers du rein	. 76
5)	ERα36 et cancers colorectaux	. 76
V-	M	écanismes de ciblage d'ERα36	. 77
1)	Le broussoflavonol B	. 77
2)	L'icaritine	. 77
3)	La cyanidine-3-o-glucoside	. 78
4)	L'epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	. 78
5)	PRMT2	. 78
Cha	pitr	e 4 : Structure et rôle du récepteur à la progestérone	. 79
I-	Le	s isoformes de PR	. 80
1)	Structure protéique	. 80
2)	Caractéristiques fonctionnelles des isoformes de PR	. 82
3)	Modifications post-traductionnelles de PR	. 84
	a)	La phosphorylation	. 84
	b)	Ubiquitination	. 85
	c)	SUMOylation	. 85
	d)	Acétylation	. 86
	e)	Méthylation	. 86
II-	Vo	ies de signalisation de PR	. 87

1) \	Voie génomique	87
a)	Fixation à la chromatine	87
b)	Remodelage de la chromatine	88
c)	Actions génomiques de PR en absence de ligand	88
d)	Crosstalk entre PR et d'autres récepteurs nucléaires	89
2) \	Voie non classique	90
a)	L'interaction PR/Src	91
b)	Rôles de la phosphorylation de PR	91
3) F	Régulation de PR par les micro-ARNs (miRNAs)	
Objectif	fs de la thèse	95
Résultat	ts	97
Discussi	ion et perspectives	139
Annexes	S	148
Référen	ces bibliographiques	153

Liste des abréviations

- AA : acide aminé
- ADC : antibody drug-conjugated
- ADN : acide désoxyribonucléique
- **AF** : activation function
- AhR : aryl hydrocarbon receptor
- ALDH1 : aldéhyde déshydrogénase 1
- AP-1 : activator protein 1
- AR : androgen receptor
- ARN : acide ribonucléique
- ATM : ataxia telangiectasia mutated
- BARD1 : BRCA1-associated RING domain protein 1
- BCL : B-cell lymphoma
- BMP2 : bone morphogenetic protein 2
- BRCA : breast cancer
- BSA : bovine serum albumin
- BUS : B-upstream segment
- CARM1 : coactivator-associated arginine methyltransferase 1
- **CBP** : CREB binding protein
- CCND1 : Cyclin D1
- CD24/44 : cluster of differentiation 24/44
- CDK2 : cyclin dependent kinase 2
- ChIP (seq) : chromatin immunoprecipitation (and sequencing)
- CK2 : casein kinase 2
- **CK8/18** : cytokeratin 8/18
- **CSC** : cancer stem cells
- CtBP1 : c-terminal binding protein 1
- **CTD** : c-terminal domain
- CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
- DFS : disease-free survival

DUSP1, 6 : dual specificity protein phosphatase 1, 6 EGCG : epigallocatechin gallate EGF : epidermal growth factor EGFR : epidermal growth factor receptor EMT : epithelial to mesenchymal transition **ER** (α, β) : estrogen receptor (alpha, bêta) ERE : estrogen responsive elements **ERK** : extracellular signal-regulated kinases FOXA1 : forkhead box protein A1 **FSH** : hormone folliculo-stimulante **GnRH** : Gonadotropin Releasing Hormone **GR**: glucocorticoid receptor HAT: histone acetyltransferase HDAC: histone deacetylase HER2: human epidermal growth factor receptor 2 HMGA1a : high-mobility group protein 1a **HRT** : hormone replacement therapy **HSP** : heat shock protein **IGF1** : insuline-like growth factor 1 **IHC** : immunohistochemistry **ΙΚΚβ** : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase **IRM** : imagerie par résonance magnétique KO: knock out LBD : ligand binding domain LH : hormone lutéinisante MAPK : mitogen-activated protein kinases MKP3 : MAP kinase phosphatase 3 NCOR1 : nuclear receptor co-repressor 1 **NES** : nuclear export signal NFkB : nuclear factor-kappa B NLS : nuclear localisation signal **OS** : overall survival

pCAF : P300/CBP-associated factor

PIAS : protein inhibitor of activated STAT

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PKA, C : protein kinase A, C

PMA : Phorbol Myristate Acetase

PR ou **PgR** : progesterone receptor

PRE : progesterone responsive elements

PRMT1 : protein arginine (R) methyltransferase

PTEN : phosphatase and TENsin homolog

PTM : posttranslational modification

RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RIP140 : receptor-interacting protein 140

ROS : reactive oxygen species

SBR : Scarff-Bloom and Richardson

S1P : sphingosine-1-phosphate

S1PR : sphingosine-1-phosphate receptor

SH3 : SRC homology 3

SHP : small heterodimer partner

SHR : steroid hormone receptors

SiRNA : small interfering ribonucleic acid

ShRNA : short hairpin ribonucleic acid

SP-1 : specificity protein 1

SphK1 : sphingosine kinase 1

SRC-1 : steroid receptor coactivator 1

STAT : signal transducer and activator of transcription

STK11 : serine/threonine kinase 11

SWI/SNF : SWItch/sucrose non-fermentable

TBP : TATA box binding protein

 $TGF-\beta$: transforming growth factor-bêta

TNBC : triple negative breast cancer

TNM : tumor nodes metastasis

TP53 : tumor protein 53

UTR : untranslated region

WT-1 : Wilm's Tumor suppressor

Liste des figures

Figure 1 : Incidence et mortalité due au cancer du sein en France de 1990 à 2015	20
Figure 2 : Anatomie de la glande mammaire	25
Figure 3 : Coupe transversale d'un canal de la glande mammaire	26
Figure 4 : Schématisation du cancer canalaire in situ et du cancer canalaire infiltrant	28
Figure 5 : Mécanisme d'action des ADCs	
Figure 6 : Biosynthèse des æstrogènes	41
Figure 7 : Organisation du cycle menstruel	43
Figure 8 : Effets des æstrogènes sur les tissus périphériques	44
Figure 9 : Organisation génique des récepteurs aux æstrogènes	46
Figure 10 : Organisation protéique d'ERα	47
Figure 11 : Structure du domaine de liaison à l'ADN d'ER	48
Figure 12 : les isoformes des récepteurs aux œstrogènes	51
Figure 13 : Voies de signalisation des récepteurs aux œstrogènes	52
Figure 14 : Les modifications post-traductionnelles d'ERα	59
Figure 15 : Organisation génique d'ERα36	64
Figure 16 : Séquence protéique d'ERα36	64
Figure 17 : <i>Mapping de la région 5' d'ERα36 et des sites de co-régulateurs</i>	65
Figure 18 : <i>Mécanisme d'activation de la voie MAPK/ERK par ERα36</i>	71
Figure 19 : Biosynthèse de la progestérone	79
Figure 20 : Structure et domaines fonctionnels des isoformes de PR	81
Figure 21 : Résidus modifiés de PR	86
Figure 22 : Mécanismes de cross-régulation entre ER et PR	90
Figure 23 : Modèle d'inhibition de l'expression de PR par le miR-513a-5p	94

Figure TS1 : <i>Profil d'extinction d'ERα36 dans les T47D</i>	150
Figure TS2 : séquence des shRNAs ciblant ERα36	152

Liste des tableaux

Tableau 1 : Méthodes d'établissement de la classification TNM	29
Tableau 2 : Etablissement des stades tumoraux à partir des critères d'évaluation TNM	30
Tableau 3 : Critères morphologiques pris en compte dans l'établissement du grade SBR	31
Tableau 4 : Classification des tumeurs mammaires selon l'expression des marqueurs moléculaires	.35
Tableau 5 : Exemples de résidus modifiés d'ERα et leurs fonctions	.58
Tableau 6 : Différences fonctionnelles entre PR-A et PR-B dans divers types tissulaires	.83

Tableau TS1 : Séquences des siRNAs ciblant ERα36	150
Tableau TS2 : Séquences des shRNAs ciblant ERα36	151

Avant-propos

Le cancer du sein est une pathologie qui touche en France plus de 50.000 femmes chaque année selon l'institut national du cancer, et constitue un réel problème de santé publique. Chaque année en France, une campagne de communication est organisée afin de sensibiliser au dépistage du cancer du sein et à récolter des fonds pour la recherche, au cours du traditionnel « octobre rose ».

Le dépistage du cancer du sein consiste à identifier la présence d'une tumeur, à partir de plusieurs critères qui définissent la taille de la tumeur, le stade ainsi que le grade, mais aussi la présence de biomarqueurs moléculaires, tels que les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone : ER α et PR.

De nombreux travaux de recherche ont vocation à étudier les voies de signalisations moléculaires de ces récepteurs dans le cancer du sein, afin d'adresser des thérapies spécifiques, dites « thérapies ciblées » à chaque patiente. L'aboutissement de ces travaux de recherche a notamment permis d'identifier des mécanismes de « cross-régulation » entre ces 2 récepteurs mais également avec d'autres récepteurs nucléaires. En effet, plusieurs études de cohortes de tumeurs, tels que le sein et la prostate ont révélé que la survie des patientes est, dans de nombreux cas dépendante de mécanismes de cross-régulation.

En 2005, ER α 36, un variant d'épissage d'ER α a été identifié. Au cours des années suivant l'identification de ce récepteur, de nombreuses études cliniques et moléculaires ont montré que son expression était corrélée à un potentiel métastatique élevé, ainsi qu'à des mécanismes de résistance à la chimiothérapie et à l'hormonothérapie. Ainsi, au cours de ma thèse, je me suis intéressé au rôle d'ER α 36 dans la signalisation de la progestérone médiée par le récepteur PR.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique autour de quatre grands axes : 1) les généralités sur le cancer du sein, 2) les récepteurs aux œstrogènes, 3) le récepteur ERα36 et 4) le récepteur à la progestérone. La seconde partie consiste en la description et à la discussion de mes travaux de thèse sous le format d'une publication.

Introduction

Chapitre 1 : Généralités sur le cancer du sein

I- Incidence

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente au niveau mondial, la deuxième cause de mortalité par cancer après les cancers pulmonaires (Source : who.int/fr). Aux États-Unis, un tiers des cancers nouvellement diagnostiqués correspondent à des cas de cancers du sein, et affectent majoritairement des femmes âgées de 40 à 55 ans, mais aussi une faible minorité âgée de moins de 40 ans (DeSantis et al., 2011, 2014). En France, l'incidence du cancer du sein a fortement progressé, voire doublé entre 1980 et 2005. En 2011, 53 000 cas ont été recensés, ce qui a représenté 33% de nouveaux cas et fait de ce fléau, un enjeu majeur de santé publique. En 2017, environ 60 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France ce qui correspond à une proportion d'environ 0,1% de la population Française (Source : e-cancer.fr). Malgré le fait que cette maladie soit responsable de 12 000 décès cette même année, le taux de mortalité quant à lui a diminué en 15 ans (Figure 1), grâce notamment à un diagnostic plus précoce de la maladie mais aussi grâce aux progrès de la médecine. De manière rare, le cancer du sein peut aussi toucher les hommes. Environ 500 cas sont diagnostiqués chaque année ce qui représente 0,5% des cancers masculins et seraient dus soit à des origines génétiques, soit à un dysfonctionnement hormonal caractérisé par l'apparition anormale de seins chez l'homme (cas de la gynécomastie) (Source : frm.org).

Le diagnostic précoce du cancer du sein constitue un moyen efficace afin de limiter la progression de la maladie et l'apparition de métastases. Ainsi, la mammographie apparaît comme la technique de référence pour le diagnostic du cancer du sein et est souvent associée à une échographie des seins et des ganglions. Dans certaines circonstances, une IRM mammaire est réalisée, mais aussi un examen anatomo-pathologique de tissus prélevés par micro- ou macro-biopsie au niveau de l'anomalie. Afin d'améliorer le diagnostic précoce de cette pathologie, le gouvernement Français a mis en place un programme de dépistage destiné aux femmes de 50 à 74 ans, qui sont invitées à se faire dépister tous les 2 ans.

Par ailleurs, la survie relative à 5 ans varie en fonction du stade du cancer au moment du diagnostic. Ainsi, pour les stades les plus précoces avec une tumeur localisée, la survie est généralement plus importante que dans les stades les plus tardifs avec dissémination ganglionnaire.



Figure 1 : Incidence et mortalité due au cancer du sein en France de 1990 à 2015 (Source : e-cancer.fr)

II- Origines du cancer du sein

A partir d'études épidémiologiques sur l'apparition de la pathologie, il a été suggéré que le cancer du sein a plusieurs origines. Ces origines sont soit génétiques avec transmission héréditaire de facteurs de risque, soit sporadiques et environnementales.

1) Facteurs génétiques

Les mutations génétiques sont impliquées à la fois dans l'apparition héréditaire du cancer du sein mais aussi dans les cas sporadiques. L'un des facteurs de risque correspond aux mutations du gène *TP53* qui sont présentes dans approximativement 40% des cancers du sein chez l'humain (Euhus and Robinson, 2013). Le gène *PTEN*, un régulateur du cycle cellulaire est quant à lui muté dans environ 10% des tumeurs mammaires. D'autres mutations affectant des gènes impliqués dans le processus de réparation de l'ADN tels que *ATM* sont aussi retrouvées mais en faible proportion (Bernstein et al., 2017; Choi et al., 2016; Rousset-Jablonski and Gompel, 2017).

Chez les femmes âgées de moins de 40 ans, la transmission héréditaire de mutations constitue le risque principal d'apparition de la maladie. Parmi les mutations génétiques favorisant l'apparition du cancer du sein, les plus communes sont celles qui touchent les gènes *BRCA1* et *BRCA2* (*BReast CAncer 1, 2*) avec une prévalence de 2 à 3% aux Etats-Unis (Winters et al., 2017). Ces gènes sont essentiels dans des mécanismes cellulaires tels que la régulation de la transcription et le maintien de l'intégrité du génome, tout en favorisant la réparation de l'ADN (Welcsh, 2001). L'incidence de leurs mutations est généralement ethno-dépendante (DeSantis et al., 2011). De plus, les tumeurs associées à la mutation de *BRCA 1 et 2* sont de grade élevé et donc très agressives (Foulkes et al., 2003; Zhong et al., 2015).

2) Facteurs hormonaux

D'autres facteurs de risque tels que l'âge et le dérèglement hormonal entrent en jeu dans le développement du cancer du sein. Le risque d'apparition du cancer du sein chez la jeune femme est peu élevé. Environ 10% des cas de cancer du sein se manifestent chez les femmes âgées de moins de 35 ans et près de 20% avant 50 ans (Source : e-cancer.fr). Bien que l'incidence du cancer du sein augmente avec l'âge, le taux de progression de la maladie a tendance à baisser dans les phases les plus tardives de la ménopause. Le cancer du sein se développe le plus souvent autour de 60 ans. De plus, près de 50% des cancers du sein sont diagnostiqués entre 50 et 69 ans et environ 28% sont diagnostiqués après 69 ans. Cette observation met en exergue le caractère hormono-dépendant du cancer du sein.

Après la ménopause, la chute du taux d'œstrogène et de progestérone dans le sang aurait pour conséquence une baisse de l'action agoniste de ces hormones dans le cancer du sein. En effet, l'exposition aux œstrogènes favorise l'apparition du cancer du sein. Ces hormones stimulent la prolifération des cellules mammaires, et leur action agoniste favorise une élévation du risque d'altérations génétiques aléatoires. Il est à noter que plus la période d'activité génitale est longue (puberté précoce avant 12 ans et ménopause tardive après 55 ans) avec une première grossesse tardive, plus la sécrétion des œstrogènes est accrue, augmentant ainsi le risque de cancer du sein (Colditz, 1998).

3) Facteurs environnementaux

a) Radiations ionisantes

Les radiations ionisantes sont des rayonnements électromagnétiques capable de produire directement ou indirectement des ions, pouvant provoquer de sérieux dommages à l'ADN. Le tissu mammaire est particulièrement sensible aux radiations ionisantes, quantifiées en unité Gray (Gy). Ainsi, l'exposition du tissu mammaire à une dose de 1 Gy augmente de 3 fois le risque de développer un cancer du sein (Key et al., 2001).

b) Risques liés à l'obésité

Plusieurs études montrent la corrélation entre l'augmentation de l'indice de masse corporelle et une incidence plus élevée du cancer du sein. En effet, après la ménopause, les femmes obèses présentent un risque plus élevé de mortalité toutes causes confondues et par cancer du sein, par rapport aux femmes non obèses atteintes d'un cancer du sein (Key et al., 2001). Dans ce contexte, plusieurs facteurs hormonaux en sont la cause. L'on note entre autres, l'augmentation du niveau d'œstrogènes due à une activité d'aromatisation excessive du cholestérol, à partir du tissu adipeux, la surexpression de cytokines pro-inflammatoires, la résistance à l'insuline, le stress oxydatif excessif, qui contribuent tous au développement du cancer du sein chez les femmes obèses (Engin, 2017).

c) Activité physique et réduction du risque

L'activité physique est connue dans le monde médical pour ses bienfaits sur le corps humain. En effet, plusieurs études ont montré qu'un mode de vie actif permet d'éviter de manière considérable le cancer du sein. L'activité physique peut réduire également le taux de récidive et augmenter le taux de survie des patientes atteintes du cancer du sein (de Boer et al., 2017). Une récente étude a notamment mis au point un programme d'activité sportive avec une application mobile permettant d'évaluer la progression du cancer du sein dans une cohorte de 60 patientes nouvellement diagnostiquées (Delrieu et al., 2018).

d) Tabac et alcool

Le tabac constitue un risque de développement de cancer du sein, bien que modeste. Le risque qui y est associé dépend de facteurs incluant la période pendant laquelle la femme a commencé à fumer (pré-puberté, puberté, ménopause...). Une étude a montré qu'il y avait des risques élevés de développer le cancer du sein chez des femmes qui ont longtemps fumé avant leur première grossesse (Catsburg et al., 2015). Par ailleurs, les femmes qui ont commencé à fumer dès l'adolescence ont un risque non négligeable de développer la maladie, dans le cas où elles seraient porteuses d'une mutation génétique héritée (Jones et al., 2017). La consommation d'alcool est associée à un risque de développer un cancer du sein, également liée à la période de consommation. En effet, la glande mammaire se développe au cours de la puberté et une consommation régulière dès la puberté, augmente le risque d'anomalies (Liu et al., 2015; Shield et al., 2016).

4) Les cellules souches cancéreuses

Des cellules cancéreuses ayant des propriétés de cellules souches seraient à l'origine de nombreux types de cancers. Les premières cellules souches cancéreuses (CSC) ont été mises en évidence dans les leucémies il y a une vingtaine d'années (Bonnet and Dick, 1997) mais ce n'est que quelques années plus tard que des CSC ont été isolées à partir de tumeurs solides.

Les CSC ont été identifiées et isolées dans une grande variété de néoplasies comme les tumeurs du système nerveux, les carcinomes de la prostate, du sein, et du côlon ainsi que les mélanomes, entre autres (Al-Hajj et al., 2003; Collins et al., 2005; Fang et al., 2005; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2003). L'origine des cellules souches cancéreuses est due soit aux facteurs environnementaux décrits précédemment, soit à des mutations génétiques dans les cellules souches normales, ce qui entraîne la dérégulation de leurs voies d'autorenouvellement et de différenciation (Yu et al., 2012). Les cellules souches cancéreuses mammaires possèdent un phénotype qui est fondé sur l'expression de marqueurs de surface, et défini par l'expression de CD44 et l'absence (ou la faible expression) de CD24 (Carrasco et al., 2014; Mansoori et al., 2017). Par ailleurs, les CSC mammaires possèdent une forte activité aldéhyde déshydrogénase (Ginestier et al., 2007). En effet, l'aldéhyde déshydrogénase est une enzyme qui intervient dans le métabolisme de l'acide rétinoique et joue un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Une étude a montré que son activation est corrélée à la formation de mammosphères dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7, associée à des capacités métastatiques (Wang et al., 2018). La présence de cellules souches cancéreuses serait par ailleurs responsable de l'hétérogénéité tumorale, observée dans les lignées cancéreuses mammaires.

III- Anatomie de la glande mammaire

Le sein est un organe innervé et richement vascularisé ayant pour fonction principale la lactation. Il contient les glandes lactogènes formées de lobules ; elles sont activées en période d'allaitement pour produire le lait maternel déversé par des canaux : les canaux galactophores, au niveau du mamelon (Figure 2).



Figure 2 : Anatomie de la glande mammaire (Source : biron.com)

1) Le compartiment épithélial

Le compartiment épithélial est constitué d'un réseau de lobules disposés en acini reliés entre eux par des canaux galactophores. Les lobules jouent un rôle principal dans la production de lait pendant l'allaitement, tandis que les canaux transportent le lait jusqu'au mamelon. Les lobules et les canaux sont constitués de deux types de cellules distincts, les cellules luminales et les cellules myoépithéliales (Figure 3). Les cellules luminales, comme leur nom l'indique, bordent la lumière des canaux et des lobules. Les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact direct avec la membrane basale et le stroma environnant (Hennighausen and Robinson, 2005). Outre ces cellules, d'autres types de cellules ont été décrites, tels que les cellules souches et les cellules progénitrices. Ces cellules sont principalement situées en position basale ou suprabasale. Le contrôle du devenir de ces cellules bipotentes vers une lignée luminale ou myoépithéliale dépend du microenvironnement et de facteurs de transcription tels que GATA-3 (Asselin-Labat et al., 2007).



Figure 3 : Coupe transversale d'un canal de la glande mammaire. Les différentes cellules épithéliales sont entourées de stroma. L'on distingue trois types de cellules : les cellules luminales en contact avec la lumière, les cellules myoépithéliales en contact avec la membrane basale (MB) et les cellules progénitrices en position basale ou supra-basales (Charafe-Jauffret et al., 2007).

2) Le compartiment mésenchymateux

Le stroma est composé de nombreux types cellulaires tels que les adipocytes, les fibroblastes, les cellules nerveuses, ainsi que les vaisseaux sanguins et un réseau lymphatique adjacent aux ganglions axillaires (Hennighausen and Robinson, 2005). Les vaisseaux lymphatiques communiquent avec les ganglions lymphatiques où sont acheminés les débris cellulaires. Ce mécanisme de fonctionnement joue un rôle important dans la progression du cancer du sein où les cellules tumorales peuvent envahir le système lymphatique et proliférer dans les ganglions, ce qui représente la première étape de la métastase. En effet, la présence de cellules tumorales à la frontière entre l'épithélium mammaire et les ganglions lymphatiques, représente un facteur pronostique clé du cancer du sein (Weigelt et al., 2005).

IV- Pathologie du cancer du sein

Les tumeurs mammaires représentent une grande variété de cancers ayant des caractéristiques biologiques et morphologiques distinctes, avec différents types de progression et de réponse aux traitements (Rakha and Ellis, 2011). La découverte du cancer du sein découle de symptômes cliniques tels que la douleur et une masse détectable. Vient ensuite une série d'examens (mammographie, biopsie) qui permettent d'établir le diagnostic. L'examen histologique permet l'identification d'un cancer du sein infiltrant, et un traitement clinique est proposé en fonction de divers facteurs pronostiques et prédictifs. Il permet aux médecins d'orienter le traitement vers la chimiothérapie, la radiothérapie ou l'hormonothérapie. Au moment du diagnostic, ces facteurs pronostiques sont liés au grade histologique de la tumeur, à ses caractéristiques moléculaires et anatomopathologiques. Ainsi tous ces facteurs sont pris en compte afin de proposer la meilleure alternative thérapeutique aux malades.

1) Critères histologiques

Les cancers les plus fréquents se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire et sont appelés adénocarcinomes. Histologiquement, il peut s'agir d'adénocarcinomes *in situ* (la membrane basale est intacte), généralement associés à un bon pronostic, ou d'adénocarcinomes infiltrants, d'évolution moins favorable (Figure 4). Les adénocarcinomes infiltrants se produisent lorsque les cellules tumorales ont franchi la membrane basale pour envahir le compartiment mésenchymateux, ce qui permet d'infiltrer les vaisseaux sanguins et les canaux lymphatiques environnants. Les adénocarcinomes représentent environ 95% de tous les cancers du sein et peuvent provenir soit des conduits mammaires, appelés ainsi adénocarcinomes canalaires (les plus fréquents, environ 85% des adénocarcinomes), soit des lobules mammaires, ce qui en fait des adénocarcinomes lobulaires (15% des adénocarcinomes) (Source : ligue-cancer.net).



Figure 4 : Schématisation du cancer canalaire in situ et du cancer canalaire infiltrant (Source : e-cancer.fr)

2) Critères anatomopathologiques

a) Le stade TNM

Au moment du diagnostic et après l'identification de la nature histologique de la tumeur, le stade TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) est identifié et permet d'évaluer l'étendue clinique de la maladie. Il est basé sur la taille de la tumeur (T), l'atteinte des ganglions lymphatiques et la présence éventuelle de métastases à distance du sein. Ces critères ont été établis par l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) et par l'AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (Tableau 1) et permettent de classer les tumeurs en 5 stades, de 0 à 4 (Tableau 2).

T : 1	T : Taille de la tumeur			
Тх	La taille de la tumeur ne peut pas être évaluée			
Т0	Pas	d'identifi	cation de tumeur primaire	
Tis	Carc	inome in	situ	
	Tis (I	DCIS)	Carcinome in situ canalaire	
	Tis (I	LCIS)	Carcinome in situ lobulaire	
	Tis (I	Paget's)	Maladie de Paget du mamelon sans tumeur sous-jacente	
T1	Tum	eur inféri	eure ou égale à deux centimètres dans sa plus grande dimension	
	T1m	i Tume	eur dont la taille est inférieure ou égale à 0,1cm dans sa plus grande dimension	
	T1a	Tum	eur dont la taille est comprise entre 0,1cm et 0,5cm dans sa plus grande dimension	
	T1b	Tume	eur dont la taille est comprise entre 0,5cm et 1cm dans sa plus grande dimension	
	T1c Tumeur dont la taille est comprise entre 1cm et 2cm dans sa plus grande dimension			
T2	Tum	eur dont	la taille est comprise entre 2cm et 5cm dans sa plus grande dimension	
T3	Tum	eur dont	la taille est supérieure à 5cm dans sa plus grande dimension	
Т4	Tumeur de toute taille avec une extension directe dans la paroi thoracique ou la peau			
	T4a Extension à la paroi thoracique			
	T4b Ulcération ou œdème (incluant peau d'orange) ou nodules satellites			
	T4c A la fois T4a et T4b			
	T4d Carcinome inflammatoire			
N:	Enval	hissemen	nt ganglionnaire régional	
	Nx	L'envah	issement ganglionnaire ne peut pas être évalué	
	NO	Pas d'er	vahissement ganglionnaire régional	
	N1	Ganglio	ns axillaires homolatéraux mobiles	
	N2 Ganglions axillaires homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures			
	N3 Ganglions mammaires internes homolatéraux			
М:	Méta	istases à	distance	
	Мx	Pas d'in	formation clinique ou radiologique indiquant des métastases à distance	
	M0	Pas de n	nétastase à distance	
	M1 Présence de métastases à distance			

Tableau 1 : Méthodes d'établissement de la classification TNM (Tumor, Nodes, Metastasis).Le critère T symbolise la tumeur initiale et est notée de TO à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Lecritère N, de NO à N3 évalue la dissémination ganglionnaire. Le critère M est noté de MO en absencede métastase, à M1 en présence de métastases (Source : American Joint Committee on Cancer 7^{ème}édition).

Stade 0	Tis	NO	M0
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	TO	N1	M0
	T1	N1	M0
Stade IIA	TO	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	TO	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
Stade IIIB	T4	NO	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Stade IIIC	Any T	N3	M0
Stade IV	Any T	Any N	M1

Tableau 2 : Etablissement des stades tumoraux à partir des critères d'évaluation TNM. La combinaison des notes obtenues pour chaque critère T, N et M permet de situer la tumeur selon les stades 0, I, II, III et IV (Source : American Joint Committee on Cancer 7^{ème} édition)

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

Cette classification permet d'évaluer le « degré » d'agressivité des tumeurs. En effet, en devenant cancéreuse, la cellule perd progressivement sa fonction biologique d'origine et se met à se développer plus rapidement que les cellules normales. De plus, les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales selon 3 critères : l'architecture cellulaire, la forme du noyau, et l'activité mitotique. Par conséquent, le grade d'un cancer correspond à la somme des notes obtenues pour chacun des trois critères. L'on obtient ainsi un score global classé de l à III qui correspond au grade histopronostique SBR. Lorsque l'on obtient les scores 3, 4 et 5, il s'agit de grade I ; pour des scores de 6 et 7, grade II et pour des scores de 8 et 9, on parle de grade III (Tableau 3). De manière générale :

- Le grade I correspond aux tumeurs les moins agressives ;
- Le grade III correspond aux tumeurs les plus agressives ;
- Le grade II est un grade intermédiaire entre les grades 1 et 3.

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

Tableau 3 : Critères morphologiques pris en compte dans l'établissement du grade

SBR (Source : e-cancer.fr)

3) Critères moléculaires

Outre les nombreuses caractéristiques pathologiques énumérées ci-dessus, plusieurs marqueurs moléculaires, fréquemment associés au développement du cancer du sein ont été étudiés dans le but d'optimiser le traitement des patientes. Ces biomarqueurs associés à des voies de signalisations cellulaires, possèdent une valeur pronostique et/ou prédictive du développement de la tumeur. Ainsi, ces marqueurs représentent une base importante pour la décision thérapeutique et déterminent la sensibilité ou la résistance de la tumeur au traitement. Par conséquent, les cliniciens analysent les tumeurs à la recherche de marqueurs moléculaires bien décrits tels que le récepteur aux œstrogènes (ER α), le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur HER2 et, plus récemment, le marqueur de prolifération Ki67. La présence ou l'absence de ces marqueurs déterminera la stratégie thérapeutique à adopter.

a) Les récepteurs aux œstrogènes (ER)

ER englobe à la fois les récepteurs ER α et ER β qui sont décrits en détail dans le chapitre 2. ER α est le biomarqueur le plus important et le plus répandu dans la classification du cancer du sein. Il a été identifié pour la première fois dans les années 1960 (Jensen, 1962, 1966; Toft and Gorski, 1966) et utilisé depuis le milieu des années 1970 dans la caractérisation clinique du cancer du sein, notamment comme indicateur principal de la réponse endocrinienne. ER α joue un rôle crucial dans la carcinogenèse mammaire, et son inhibition est le pilier de la thérapie endocrinienne du cancer du sein. Le statut ER α a été démontré comme étant le principal déterminant des portraits moléculaires du cancer du sein par de nombreuses études de profil d'expression génique (Dai et al., 2014; Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001a). En effet, les tumeurs ER α -positives représentent jusqu'à 75% de toutes les patientes atteintes du cancer du sein (Anderson et al., 2002). De plus, Les tumeurs ER α -positives sont le plus souvent bien différenciées, moins agressives et associées à de meilleurs résultats après chirurgie (Dunnwald et al., 2007) que les tumeurs ER α -négatives (Putti et al., 2005).

b) Le récepteur à la progestérone (PR)

L'expression de PR est retrouvée dans 65 à 75% des cancers du sein (Ravdin et al., 1992; Stendahl et al., 2006) et PR constitue un biomarqueur pronostic du développement tumoral. En effet, l'expression de ce récepteur est considérée comme un marqueur de fonctionnalité d'ER α , car PR est un gène cible d'ER α (PR est décrit dans le chapitre 4). Cependant, les tumeurs ER α -positives n'expriment pas toutes PR, étant donné que 40% des tumeurs ER α -positives sont PR-négatives (Rakha et al., 2007). De manière intéressante, PR possède 2 isoformes : PR-A et PR-B et le ratio de ces 2 isoformes conditionnerait la réponse aux thérapies endocriniennes pour un sous-groupe de patientes ER+/PR+ (Hopp et al., 2004).

c) Le récepteur HER2

La croissance, la différenciation, et le fonctionnement des cellules mammaires normales et cancéreuses sont en partie régulées par une famille de récepteurs aux facteurs de croissance épidermique humain (HER-1, 2, 3 et 4), qui sont des récepteurs membranaires ayant une activité tyrosine kinase. En effet, l'expression de HER2 dans le cancer du sein est cliniquement reconnue depuis 1987 (Slamon et al., 1987) et HER2 représente un biomarqueur pronostic du cancer du sein. De nombreuses études ont révélé que l'amplification du gène *ErbB2* ou la surexpression de la protéine HER2 sont associées à un mauvais pronostic (Bartlett et al., 2003; Chia et al., 2008; Wunderle et al., 2019). La surexpression de HER2 survient dans 13 à 20% des cancers du sein invasifs, dont plus de la moitié (environ 55%) sont négatifs pour les récepteurs ER α et PR (Quénel et al., 1995; Slamon et al., 1987). Par ailleurs, l'expression de HER2 est un marqueur prédictif de l'efficacité clinique des anthracyclines, utilisées en chimiothérapie (Thor et al., 1998; Wood et al., 1994).

d) Ki67

Ki67 est une protéine majoritairement nucléaire, exprimée dans les cellules en prolifération, absente dans les cellules quiescentes. C'est un marqueur de prolifération qui a été identifié pour la première fois en 1983 (Gerdes et al., 1983).
Cette protéine est exprimée au cours du cycle cellulaire, avec une expression plus élevée pendant la phase mitotique (Lopez et al., 1991), permettant de maintenir les chromosomes séparés au cours de la télophase (Cuylen et al., 2016). Une faible expression de Ki67 dans la tumeur primaire est associée à un plus grand bénéfice clinique apporté par un traitement endocrinien (Delpech et al., 2012; Reyal et al., 2013). Du fait de sa fonction proliférative, Ki67 est un marqueur prédictif de l'efficacité de la chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante dans le cancer du sein (Reyal et al., 2013).

4) Classification selon l'expression des marqueurs moléculaires

Les cancers mammaires sont généralement classés en trois principaux groupes, selon l'expression des marqueurs moléculaires : ERα, PR et HER2 (Tableau 4). Ainsi, l'on distingue les cancers de type luminal (ER et/ou PR positifs), les cancers HER2 positifs (*HER2-enriched*) et les cancers triple-négatifs (*TNBC : Triple Negative Breast Cancer* ou « *basal-like* ») qui sont caractérisés par l'absence de ces trois marqueurs (Dai et al., 2016; Kumar and Aggarwal, 2016).

Le cancer du sein de type « luminal A » est le plus commun et représente environ 50 à 60% de la totalité des tumeurs mammaires. Il est caractérisé par l'expression d'ERα ainsi que de gènes cibles, classiquement retrouvés dans l'épithélium luminal bordant les canaux mammaires. Les cellules tumorales de ce sous-type possèdent un phénotype ERα (+) /PR (+) et expriment la cytokératine CK8/18. Il est à noter que le statut ERα positif est attribué aux tumeurs dont les cellules présentent une expression nucléaire du récepteur ERα. Ce sous-type tumoral est associé à un meilleur pronostic avec un taux de survie plus important que les autres sous-types. Le sous-type luminal A possède des similarités moléculaires avec le « luminal B » qui peut être soit ERα (+)/ PR(+)/ HER2(+) soit ERα (+)/ PR(+)/ HER2(-) avec une forte expression du marqueur Ki67 (Dai et al., 2016; Eroles et al., 2012).

Les tumeurs appartenant au groupe « luminal B » constituent 10 à 20% de tous les cancers du sein et sont associées à un mauvais pronostic, avec un caractère plus agressif et un grade plus élevé que le sous-type luminal A.

- Le sous-type « HER2 positif » doit son nom à l'amplification du gène *ErbB2* (HER2), responsable de divisions accrues des cellules mammaires. Il constitue 15 à 20% des cancers du sein. Les tumeurs HER2 positives sont généralement négatives pour l'expression d'ERα et de PR (Pourteimoor et al., 2016) et sont fréquemment associées à un mauvais pronostic et au développement de métastases.
- Le sous-type « triple négatif » ou « basal-like » est de phénotype ERα-/ PR-/ HER2- et représente 10 à 20% des carcinomes mammaires. Ces tumeurs sont généralement de haut grade, selon la classification anatomopathologique et sont les plus agressives avec le plus faible taux de survie. Les cancers triple négatifs ont un taux de prolifération très élevé et expriment des gènes codant pour des protéines qui régulent positivement le cycle cellulaire telles que les cyclines et CKDs. Par ailleurs, le gène suppresseur de tumeur : *TP53* est fréquemment muté dans ce sous-type.

Sous-Type	Marqueurs Moléculaires	Grade Histologique	Origine	Pronostic	Autres Caractéristiques	
Luminal A	ER+/PR+/HER2-	Faible	Cellules épithéliales luminales	Bon	- Meilleure survie globale	
Luminal B	ER+/PR+/HER2+ Ou ER+/PR+/HER2- avec Ki-67 élevé	Intermédiaire/ Elevé	Cellules épithéliales luminales	Intermédiaire/ Mauvais	- Métastases dans le foie	
HER2 positif	ER-/PR-/HER2+	Elevé	Progéniteurs luminaux tardifs	Mauvais	- Apparition de métastases précoces notamment au niveau des ganglions lymphatiques - Rechute fréquente	
Basal-like	ER-/PR-/HER2-	Elevé	Cellules basales- myoépithéliales	Mauvais	 Fréquent chez les femmes africaines Agressif Dysfonctionnement de BRCA1 	

Tableau 4 : Classification des tumeurs mammaires selon l'expression des marqueurs moléculaires (Lattouf, 2017)

5) Les traitements du cancer du sein

Il existe trois types de traitements qui sont utilisés pour traiter les cancers du sein : la chirurgie, la radiothérapie, les traitements médicamenteux (chimiothérapie, thérapies ciblées, hormonothérapie, immunothérapie). Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés les uns aux autres. Les rôles de ces traitements sont divers. Selon les cas, ils permettent de supprimer la tumeur ou les métastases, de réduire le risque de récidive, de réduire le développement de la tumeur ou des métastases, de traiter les symptômes engendrés par la maladie. Le choix du traitement dépend du type histologique, du stade/grade de la tumeur et des critères moléculaires préalablement énumérés.

a) La chirurgie

La chirurgie a pour objectif d'enlever la tumeur (chirurgie conservatrice, mastectomie partielle) ou le sein (mastectomie totale). Elle peut être le seul traitement réalisé ou être suivie d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie et/ou d'une hormonothérapie. Ces traitements complémentaires de la chirurgie sont dits adjuvants.

L'intervention est parfois précédée d'une chimiothérapie ou d'une hormonothérapie en vue de réduire la taille de la tumeur et de faciliter l'intervention. Ces traitements réalisés avant l'intervention sont dits néo-adjuvants.

b) La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants afin de détruire les cellules cancéreuses. Elle consiste à diriger de manière précise ces rayonnements (appelés aussi rayons ou radiations) sur la zone à traiter, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants, dits organes à risque.

36

Ainsi l'on distingue : la radiothérapie externe, qui utilise une source externe de rayonnements dirigés, à travers la peau, vers la zone à traiter (modalité la plus fréquente pour la radiothérapie des cancers du sein) ou encore la curiethérapie, qui utilise une source radioactive placée à l'intérieur du corps, directement au contact de la zone à traiter. Dans le cas du cancer du sein, elle est peu fréquemment utilisée.

c) La chimiothérapie

Administrée le plus souvent par voie intraveineuse, la chimiothérapie permet de détruire les cellules cancéreuses en prolifération. De nombreux médicaments peuvent être utilisés pour traiter le cancer du sein : le méthotrexate, le fluoro-uracile, les anthracyclines, les agents alkylants tels que le cyclophosphamide, les médicaments de la famille des taxanes (paclitaxel, docétaxel). Etant donné que ces médicaments ciblent aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules normales, l'utilisation de la chimiothérapie est souvent associée à des effets secondaires.

d) L'hormonothérapie

Certaines tumeurs du sein ont pour caractéristique d'être hormonosensibles, ce qui signifie que les hormones féminines (œstrogènes, progestérone), naturellement produites par l'organisme, stimulent leur croissance. Il s'agit généralement des tumeurs du sous-type luminal. L'hormonothérapie est un traitement qui consiste à empêcher l'action stimulante des hormones féminines sur les cellules cancéreuses.

L'on distingue deux types d'hormonothérapie :

 Les traitements médicamenteux, qui agissent par voie générale, c'està-dire dans l'ensemble du corps, sur toutes les cellules sensibles aux hormones. On parle de traitement systémique. Les traitements non médicamenteux, qui consistent à stopper la production d'œstrogènes par les ovaires en les retirant par une intervention chirurgicale (ovariectomie) ou en les irradiant (radiothérapie).

Les médicaments qui sont généralement utilisés dans le cadre de l'hormonothérapie sont : les anti-œstrogènes tels que le tamoxifène et le fulvestrant qui bloquent l'activité agoniste des œstrogènes *via* leurs récepteurs, et les anti-aromatases qui bloquent la biosynthèse des œstrogènes. En France, les anti-aromatases les plus utilisés sont le létrozole, l'anastrozole et l'exémestane.

e) Les anticorps monoclonaux humanisés

La plupart des anticorps monoclonaux humanisés ont pour objectif de cibler la protéine HER2, située à la surface des cellules mammaires, et dont la surexpression est corrélée à un mauvais grade tumoral. L'un des anticorps les plus commercialisés est le trastuzumab (ou herceptine) qui cible le domaine extracellulaire de HER2 (Carter et al., 1992). Il existe d'autres anticorps monoclonaux qui ciblent HER2 : le bévacizumab, le pertuzumab.

f) Les ADCs (Antibody Drug Conjugated)

Les ADCs sont des anticorps couplés soit à une drogue cytotoxique, généralement utilisée en chimiothérapie, soit à un agent radioactif ou une toxine. Le principe de cette classe d'agent thérapeutique est d'utiliser la spécificité d'un anticorps pour cibler la cellule tumorale et libérer à l'intérieur de celle-ci, le composé hautement toxique qui lui est couplé (Figure 5). L'intérêt de cette technologie est de contrôler la spécificité des agents cytotoxiques tumoraux tout en évitant des effets secondaires.



Figure 5 : Mécanisme d'action des ADCs. L'anticorps couplé à une drogue va reconnaître un antigène tumoral à la surface de la cellule et, après fixation, va être internalisé dans la cellule. La drogue couplée à l'anticorps va être libérée dans le milieu intracellulaire par endocytose. Certains composés peuvent agir sur les cellules voisines après transport ou diffusion à travers la membrane plasmique (Haeuw et al., 2009)

Chapitre 2 : les récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs aux œstrogènes (*ER : Estrogen Receptors*) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et plus précisément à la sous-classe des récepteurs stéroïdiens. L'action des récepteurs aux œstrogènes s'effectue après la fixation de leurs ligands qui sont les œstrogènes. Ce chapitre aura pour objet de donner une vue globale sur le fonctionnement de ces récepteurs, de la biosynthèse des œstrogènes ainsi que leur physiologie, jusqu'aux voies de signalisations régulées par cette hormone.

I- Les œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones présentes majoritairement chez la femme non ménopausée et aussi chez l'homme, bien qu'en faible quantité par rapport à la femme. Ces hormones ont des actions biologiques diverses telles que le développement des caractères sexuels secondaires, ainsi que le contrôle du cycle menstruel.

1) Biosynthèse et métabolisme des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones sexuelles stéroïdiennes dérivées du cholestérol et composées d'un squelette polycyclique de 4 cycles (A, B, C, D). Les 3 principaux œstrogènes sont :

- L'œstrone (E₁) produit pendant la ménopause par l'aromatisation des androgènes.
- Le 17β-œstradiol (E₂) qui est la forme majoritaire sécrétée par l'ovaire chez la femme non gestante et qui est obtenue après aromatisation de la testostérone.
- L'œstriol (E₃) qui est produit principalement pendant la grossesse par le placenta.

De manière générale chez la femme, les œstrogènes sont des composés lipophiles synthétisés dans les ovaires et en moindre quantité dans le cortex surrénalien. Le mécanisme de production des œstrogènes débute lorsque le cholestérol se lie aux récepteurs des lipoprotéines. Il est ensuite absorbé par les cellules stéroïdogènes puis stocké et déplacé vers les sites de synthèse des stéroïdes.

En effet, la première étape de la synthèse des œstrogènes est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol (Figure 6), puis la formation de progestérone qui conduit à la formation des androgènes (la testostérone et l'androsténedione). Les androgènes, précurseurs des œstrogènes sont synthétisés dans les cellules thécales des ovaires (ou cellules de la thèque interne), et diffusent dans les cellules de la granulosa afin d'être convertis en œstrogènes. L'aromatisation est l'étape finale de synthèse des œstrogènes catalysée par un complexe enzymatique composé notamment du cytochrome P450.



Figure 6 : Biosynthèse des œstrogènes. La synthèse des œstrogènes débute dans les gonades (ovaires et testicules), à partir du cholestérol qui va subir plusieurs transformations par des enzymes Adapté de (Fontaine, 2014).

Au cours de la ménopause, les fonctions ovariennes sont en arrêt ce qui a pour conséquence l'arrêt de production d'œstrogènes par les ovaires. Par conséquent les œstrogènes sont synthétisés à partir de sources périphériques diverses telles que le tissu adipeux, les glandes surrénales, la glande mammaire, les os, les muscles lisses et le foie. Chez l'homme, les œstrogènes sont formés dans le testicule et dans les glandes corticosurrénales. Dans le testicule, la voie de biosynthèse des œstrogènes est initiée dans les cellules de Leydig et les androgènes sont aromatisés en œstrogènes dans les cellules de Sertoli. Après leur synthèse, les œstrogènes sont sécrétés dans la circulation sanguine. Seulement 2% de l'œstradiol circulant est sous forme libre, le reste étant lié à des protéines de transport telles que l'albumine et la globuline.

2) Le cycle hormonal

Chez la femme non ménopausée, l'ovaire a une double fonction : exocrine et endocrine. La première assure la maturation du gamète femelle, l'ovocyte. La deuxième permet une concentration hormonale au niveau de l'appareil reproducteur nécessaire à la fécondation de l'ovocyte et à l'implantation de l'œuf fécondé. La synthèse d'œstrogènes par les ovaires est stimulée par des hormones antéhypophysaires, la FSH (Follicule Stimuling Hormone) et la LH (*Luteinizing Hormone*), elles-mêmes régulées par la GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone*) qui est produite par l'hypothalamus. L'activité ovarienne au cours du cycle peut être divisée en 2 grandes phases : la phase folliculaire (12 à 16 jours) et la phase lutéale (10 à 16 jours). Au cours de la phase folliculaire, l'hypophyse sécrète la LH et la FSH qui sont acheminées par le sang jusqu'aux ovaires, entraînant la maturation de plusieurs follicules ovariens (Figure 7). Les follicules ovariens sécrètent des œstrogènes, responsables d'un épaississement de la muqueuse interne de l'utérus (endomètre), afin de préparer l'utérus à recevoir l'œuf fécondé. Lors de la première partie de la phase folliculaire, les faibles concentrations d'œstradiol exercent un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des hormones hypothalamiques (GnRH) et hypophysaires (LH et FSH). Tout au long de la phase folliculaire, la concentration d'œstradiol est progressivement augmentée jusqu'à atteindre un seuil qui va déclencher un rétrocontrôle positif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La concentration en LH va atteindre un pic conduisant à l'éclatement du follicule et à l'ovulation. Le follicule mature qui s'est rompu pour libérer un ovule, dégénère et se transforme en corps jaune, qui, sous l'influence de la LH sécrète de la progestérone et en plus faible quantité de l'œstradiol.

La progestérone et l'œstradiol ainsi sécrétés, réduisent à leur tour la sécrétion de LH par rétrocontrôle négatif. Si l'ovocyte n'est pas fécondé, le corps jaune régresse en 9 à 11 jours après l'ovulation. Le déclin des taux d'œstradiol et de progestérone entraîne alors la desquamation de l'endomètre éliminé par le flux menstruel.



Figure 7 : Organisation du cycle menstruel. Les hormones FSH et LH sont produites par le complexe hypothalamo-hypophysaire et vont être véhiculées via la circulation sanguine. Au cours du cycle, les variations de ces hormones vont influencer la sécrétion des hormones ovariennes (æstrogènes et progestérone) afin de réguler la maturation de l'ovocyte et l'ovulation, mais aussi la menstruation, lorsque l'ovocyte n'est pas fécondé (Source : cngof.fr).

3) Physiologie des œstrogènes

En plus de leur rôle endocrine sur les fonctions ovariennes, les œstrogènes agissent sur de nombreux tissus périphériques (Figure 8) et occupent donc un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie. Les œstrogènes sont essentiels pour les fonctions reproductrices, telles que la différenciation, le développement, le maintien du système reproducteur chez la femme ainsi que la féminisation (Carpenter and Korach, 2006). Dans les tissus mammaires, les œstrogènes stimulent la croissance et la différenciation de l'épithélium ductal mais aussi le développement du cancer du sein et de l'endomètre (Gruber et al., 2002).

Par ailleurs, les œstrogènes jouent un rôle important dans le métabolisme des lipides et des glucides, l'homéostasie squelettique, l'équilibre électrolytique, la physiologie de la peau, le système cardiovasculaire, le foie ainsi que le système nerveux central. En effet, de nombreuses études ont montré une corrélation entre le déficit en œstrogènes et l'apparition de diverses pathologies.



Figure 8 : Effets des œstrogènes sur les tissus périphériques. Adapté de (Gruber et al., 2002)

Chez la femme, un déficit en œstrogènes entraîne l'apparition d'une série d'anomalies cardiométaboliques. Ces anomalies ont pour conséquence le déclenchement de maladies cardiovasculaires, de fortes prises de poids et un déficit de l'activité de l'insuline (Hamilton et al., 2016). Dans le cerveau, les œstrogènes sont connus pour réguler la croissance ainsi que la différenciation des axones et dendrites (Lee et al., 2012). Un déficit important en œstrogènes est associé à une plus grande susceptibilité chez la femme à développer la maladie d'Alzheimer (Yue et al., 2005). Après la ménopause, une perte des fonctions ovariennes est associée à un risque significatif du développement de l'ostéoporose qui se traduit par une perte osseuse et une susceptibilité plus importante aux fractures (Stevenson, 2011). Par ailleurs, en 2019, une étude chez des rats a montré le rôle protecteur des œstrogènes contre le stress oxydatif caractérisé par l'induction, œstrogène-dépendante, de gènes antioxydants (Díaz et al., 2019).

II- Les récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes exercent leurs effets biologiques dans la cellule en se liant à leurs récepteurs. L'existence des récepteurs aux œstrogènes a été démontrée pour la première fois par Elwood Jensen (Jensen, 1962). Le premier récepteur identifié, nommé ERa, a été cloné en 1986. Quelques années plus tard, l'existence d'un autre récepteur : ERß a été mise en évidence. ERß a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de prostate et d'ovaire de rat (Kuiper et al., 1996). ERa et ERß sont des facteurs de transcription membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons principalement sur ERa, ses voies de signalisations ainsi que l'activité biologique d'un de ses variants d'épissage : ERa36.

1) Structure

a) Structure génique

ERα et ERβ sont respectivement codés par des gènes nommés *ESR1* et *ESR2*. Ces 2 gènes, bien que provenant de différents loci chromosomiques, partagent une forte homologie structurale. Chez l'Homme, le gène *ESR1* qui code pour ERα est localisé sur le locus chromosomique 6q25.1 (Menasce et al., 1993). *ESR1* possède plus de 140 kilobases et comporte 8 exons qui codent pour une protéine de 595 acides aminés (Figure 9A). En 2005, un neuvième exon a été découvert en aval de l'exon 8 (Wang et al., 2005). A l'exception de la région 5' non traduite et de l'exon 9, la séquence du gène *ESR1* est fortement conservée entre les espèces.

ERβ quant à lui est codé par le gène *ESR2* (Figure 9B) qui est localisé sur le locus chromosomique 14q23.2 chez l'Homme. Ce gène code pour une protéine de 530 acides aminés (Enmark et al., 1997).



Figure 9 : Organisation génique des récepteurs aux œstrogènes. A : Structure d'ESR1, le gène qui code pour ERα avec sa composition en introns et exons (Ex), les sites d'initiation et de terminaison de la traduction ; et en dessous, la structure protéique correspondante. Adapté de (Ponglikitmongkol et al., 1988). B : Structure d'ESR2, le gène qui code pour ER6. Adapté de (Zhao et al., 2008).

b) Structure protéique

La superfamille des récepteurs nucléaires est composée de récepteurs présentant de grandes homologies structurales et fonctionnelles. La plupart de ces récepteurs sont des facteurs de transcription, qui, une fois liés à leur ligand, vont se fixer au niveau de l'ADN.

ERα et ERβ sont organisés en 5 domaines fonctionnels, désignés de A à F (Figure 10), depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale (Kumar et al., 1987).



Figure 10 : Organisation protéique d'ERα. les domaines numérotés de A à F correspondent à des domaines fonctionnels.

- Le **domaine A/B** comprend le domaine de transactivation de la transcription indépendante du ligand. Ce domaine est nommé AF-1 (*Activation Function 1*).
- Le domaine C comprend le domaine de liaison à l'ADN (*DBD : DNA Binding Domain*) qui va se fixer sur des éléments de réponse sur la chromatine appelés ERE (*Estrogen Responsive Elements*). Les ERE sont des séquences d'ADN situées au niveau du promoteur des gènes cibles. Le domaine C comporte 2 motifs en doigts de zinc dans lesquels quatre cystéines coordonnent de façon tétraédrique un atome de zinc (Figure 11). Un motif, appelé P-box est situé à la base du premier doigt de zinc et permet la reconnaissance des ERE.

Un autre motif appelé D-box est situé à la base du deuxième doigt de zinc et est impliqué dans le processus de dimérisation du récepteur (Ponglikitmongkol et al., 1988).

- Le domaine D, aussi appelé domaine *Hinge* assure la flexibilité du récepteur au niveau de l'ADN. Il contient également un signal de localisation nucléaire.
- Le domaine E qui est le plus vaste contient le domaine de liaison au ligand (*LBD : Ligand Binding Domain*) assurant la fixation du ligand. Le domaine E contient également une fonction de transactivation de la transcription (AF-2) qui est ligand-dépendante.
- Le domaine F, situé à l'extrémité C-terminale du récepteur est encore très peu connu.
 Cependant il pourrait moduler l'activité transcriptionnelle d'ERα et les interactions protéines-protéines, notamment avec SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator*-1) (Koide et al., 2007).



Figure 11 : Structure du domaine de liaison à l'ADN d'ER. Adapté de (Ponglikitmongkol et al., 1988)

ERα et ERβ partagent 98% d'homologie dans leur DBD (Pace et al., 1997) alors qu'ils diffèrent largement au niveau de leurs domaines d'activation de la transcription (moins de 15% d'homologie dans leur domaine N-terminal). En effet, la partie N-terminale d'ERβ est plus courte d'environ 40 acides aminés par rapport à ERα. Son activité transcriptionnelle AF-1 est ainsi réduite de manière considérable. Par conséquent, ER α et ER β recrutent de manière différente des protéines co-activatrices, modifiant ainsi leurs effets transcriptionnels spécifiques (Hall and McDonnell, 1999). ER α et ER β partagent une homologie de 59% dans leur LBD (Jia et al., 2015), ce qui influence leur affinité pour leurs ligands. Par ailleurs, ER α est associé à la prolifération cellulaire alors que ER β aurait un rôle antiprolifératif (Krege et al., 1998).

2) Les isoformes des récepteurs aux œstrogènes

Outre les formes canoniques des récepteurs aux œstrogènes (ERα et ERβ), il existe d'autres récepteurs dérivés de ces formes et provenant d'épissage alternatif. ERα, connu aussi sous le nom de ERα66 possède une séquence peptidique de 66 kDa. Les variants décrits à ce jour sont ERα46, ERα36 (Figure 12A) et plus récemment ERα30.

L'isoforme ERα46 (46 kDa) est transcrite à partir d'un promoteur alternatif qui se trouve dans l'exon 2 du gène ESR1. Une récente étude a montré que l'expression d'ERα46 est due à l'action de l'oncoprotéine HMGA1a (*High Mobility Group A protein 1a*). En effet, HMGA1a régule l'épissage alternatif d'ESR1 dans la lignée MCF-7 et augmente l'expression de l'ARNm précurseur d'ERα46 (Ohe et al., 2018).

Structurellement, ER α 46 est dépourvu du domaine de transactivation de la transcription (AF-1), contenu dans l'isoforme ER α . ER α 46 a été identifié à partir de cellules issues d'un adénocarcinome mammaire en 1996 (Trivedi et al., 1996). De plus, il a été démontré que ce variant réprime l'activité d'ER α (Flouriot et al., 2000) *via* le recrutement de corépresseurs (Penot et al., 2005). Le rôle d'ER α 46 a aussi été étudié dans les mécanismes de résistance au tamoxifène, traitement classique des tumeurs exprimant ER α . En effet, une étude a montré que la réexpression d'ER α 46 dans des lignées cancéreuses mammaires résistantes au tamoxifène, était associée à une meilleure sensibilité de ces cellules et ainsi à une baisse de leur prolifération (Klinge et al., 2010). Par ailleurs, l'étude de l'expression d'ER α 46 était exprimé dans plus de 70% des tumeurs (Chantalat et al., 2016). L'absence (ou la faible expression) d'ER α 46 était corrélée à des tumeurs de grande taille et de grade SBR élevé.

En outre, dans cette même cohorte, l'expression d'ER α 46 a été souvent retrouvée plus importante que celle de la forme canonique ER α ; et de manière intéressante, ces deux isoformes possèdent une affinité différente pour le 17 β -oestradiol (Chantalat et al., 2016; Lin et al., 2013).

- L'isoforme ERα36 (36 kDa) qui fait l'objet de ce manuscrit sera décrite en détail dans le chapitre 3.
- L'isoforme ERα30 (30 kDa), découverte très récemment, a été identifiée et clonée à partir de tissus mammaires cancéreux. Structurellement, ERα30 ne contient pas les domaines AF-2, LBD, ainsi qu'une partie du domaine *Hinge* de la forme canonique ERα. Par ailleurs, cette isoforme possède une séquence unique de 10 acides aminés localisés à son extrémité C-terminale (Zhu et al., 2018a). Les premières études conduites sur ce variant d'épissage ont montré que la surexpression d'ERα30 dans la lignée mammaire triple négative (MDA-MB-231) était associée à un potentiel prolifératif, invasif et migratoire (Zhu et al., 2018a).

ERβ possède lui aussi des variants d'épissage (Figure 12B) qui ont été identifiés dans des tumeurs du sein (Davies et al., 2004). Le rôle de ces isoformes n'est pas clairement décrit mais leurs implications dans des phénomènes de résistance à l'hormonothérapie est suspecté (Skliris et al., 2006).





III- Mode d'action des récepteurs aux œstrogènes

Les œstrogènes, impliqués entre autre dans la prolifération, le développement et la différenciation mammaire, induisent leurs actions *via* leurs récepteurs à travers deux voies de signalisation. La première nécessite des heures ou des jours pour entraîner des modifications transcriptionnelles des gènes cibles. Elle est connue sous le nom de voie de signalisation **génomique, ou nucléaire**, tandis que la seconde se produit habituellement dans le cytoplasme pendant une période moins longue (de quelques secondes à quelques minutes) après stimulation aux œstrogènes, et commence habituellement au niveau de la membrane plasmique. Cette seconde voie de signalisation est également connue sous le nom de voie de signalisation signalisation **non génomique, extra-nucléaire ou rapide.** Les récepteurs aux œstrogènes sont également impliqués dans des voies de signalisation indépendantes de l'hormone.



Figure 13 : Voies de signalisation des récepteurs aux œstrogènes. ER désigne à la fois ERα et ER6. A, B : Les voies de signalisations génomiques. C : La voie de signalisation indépendante des œstrogènes. D : La voie de signalisation non génomique (Le Romancer et al., 2011).

1) La voie génomique

a) La voie génomique directe

La voie génomique directe est activée lorsque l'œstrogène (E₂) se lie à ER, ce qui induit un changement de conformation du récepteur. En effet, dans son état inactif, ER est associé à des protéines chaperonnes Hsp90 (*Heat Shock Protein*) qui permettent de séquestrer et stabiliser le récepteur, en absence de ligand (Johnson et al., 1994). Ainsi, la présence d'E₂ entraîne une dissociation du récepteur des Hsp90 et ensuite une dimérisation du récepteur. Après dimérisation, ER transloque dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles en se liant directement à des séquences d'ADN spécifiques : les ERE (Figure 13A). Les ERE sont généralement reconnus *via* une séquence consensus palindromique de 13 paires de bases (GGTCANNNTGACC, N étant un nucléotide variable) (Klein-Hitpass et al., 1986).

Le séquençage du génome humain a permis la découverte d'environ 70.000 EREs, ce qui correspond à un ERE tous les 43 kb d'ADN (Bourdeau et al., 2004). Ainsi, les EREs, qui couvrent une très grande partie du génome humain seraient impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires.

Au cours de la voie génomique directe, le changement conformationnel des ERs facilite l'association et la dissociation de co-régulateurs enzymatiques associés à l'activité de la chromatine (Fullwood et al., 2009). Ces protéines sont soit des histones acétyltransférases telles que p300/CBP (*CREB binding protein*), pCAF (*p300/CBP associated protein*), soit des histones méthyltransférases telles que PRMT1, CARM1 ou encore des complexes ATPases tels que SWI/SNF, qui participe au remodelage de la chromatine. Après fixation sur un ERE, ERα active la transcription de gènes cibles *via* ses domaines AF-1 et AF-2, et en présence de coactivateurs. Les principaux coactivateurs de la transcription induite par ERα sont les SRC (*Steroid Receptor Coactivator*) qui appartiennent à la famille des protéines p160. Ces protéines interagissent avec le complexe E₂-ERα par l'intermédiaire de motifs LxxLL (Yi et al., 2015) présents sur de nombreux co-activateurs. Une fois que les corégulateurs sont recrutés au niveau des EREs, un autre complexe : Mediator entre en jeu. Ce complexe recrute la machinerie transcriptionnelle contenant l'ARN polymérase II et TBP (*TATA binding protein*) afin d'initier la transcription (Rosenfeld et al., 2006).

Un des facteurs pionniers de la machinerie transcriptionnelle d'ER α est la protéine FOXA1 (*forkhead protein*) aussi appelée HNF3 α (Cirillo et al., 1998). FOXA1 est un coactivateur essentiel, qui contribue à la fixation d'ER α sur la chromatine (Carroll et al., 2005). En effet, FOXA1 se lie à la chromatine *via* son domaine C-terminal qui se lie aux histones H3 et H4 (Cirillo et al., 2002). C'est une protéine impliquée dans l'expression de gènes qui favorisent la progression du cycle cellulaire (Laganière et al., 2005). Le rôle de FOXA1 a notamment été décrit dans la transcription du gène *CCND1* (Cycline D1), qui est induite lorsque FOXA1 modifie l'état de la chromatine (Eeckhoute et al., 2006). Avec *ESR1*, le gène *FOXA1* constitue une des signatures qui définissent le caractère luminal des tumeurs mammaires (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001b). Par ailleurs, dans des lignées tumorales mammaires, il a été montré que ER α se fixe sur la chromatine même en absence d'œstrogène, mais de manière dépendante de FOXA1 (Hurtado et al., 2011).

Une autre protéine clé dans l'activité transcriptionnelle d'ERα est GATA3. En effet, ERα, FOXA1 et GATA3 forment toutes les 3 un « *core complex* » qui active la transcription sous œstrogènes, de gènes impliqués dans la progression tumorale (Eeckhoute et al., 2007).

En outre, il est important de noter que toutes les protéines qui se lient à ER α , ne sont pas seulement des coactivateurs.

En effet, deux protéines : RIP140 (*Receptor-Interacting Protein*) et SHP (*Short Heterodimer Partner*) ont été suggérées dans un premier temps comme étant des corépresseurs.

- Au début des années 2000, RIP140 a été décrite pour la première fois comme étant un corégulateur négatif de la transcription induite par ERα. En effet d'après une étude parue en 2000, la région N-terminale de RIP140 est capable de recruter des protéines HDACs de type 1 et 2 (Wei et al., 2000) qui vont « verrouiller » l'accès d'ERα à la chromatine. De plus, deux motifs identifiés dans la région centrale de RIP140 lui permettent de recruter les protéines CtBP1 et CtBP2 (*C-terminal Binding Protein*) qui régulent négativement la transcription (Vo et al., 2001). Cependant, une étude plus récente a décrit RIP140 plutôt comme étant un coactivateur d'ERα. En effet, grâce à des expériences de chIP-seq, il a été montré que RIP140 occupe plus de 80% des sites de fixation d'ERα sur la chromatine (Rosell et al., 2014). Par ailleurs RIP140 est impliquée dans la transcription ERα-dépendante et ainsi dans la prolifération des cellules cancéreuses mammaires.
- SHP, quant à lui, est un récepteur nucléaire capable d'interagir avec ERα via le domaine
 AF-2 d'ERα, réprimant ainsi son activité transcriptionnelle (Johansson et al., 2000).

b) La voie génomique indirecte

Outre la voie génomique directe au cours de laquelle le récepteur aux œstrogènes se lie directement à l'ADN sur des ERE, une proportion de ce récepteur active la transcription de gènes cibles en se liant à d'autres facteurs de transcription déjà présents sur la chromatine (Figure 13B). Ces facteurs de transcription se lient sur des éléments de réponse différents des ERE, et ER agit dans ce cas comme cofacteur transcriptionnel.

Ce mécanisme est appelé : voie génomique indirecte ou voie génomique ERE-indépendante. Par ce mécanisme, les récepteurs aux œstrogènes régulent un panel de gènes sans passer par les ERE. Il est à noter que ce mécanisme d'activation de la transcription est partagé par d'autres récepteurs nucléaires stéroïdiens (Göttlicher et al., 1998).

Il existe plusieurs gènes qui sont activés par l'œstrogène (E₂) *via* l'interaction d'ER avec des facteurs de transcription tels que SP-1 (*Specificity Protein 1*), NF-κB (*Nuclear Factor- κB*) et la protéine AP-1 (*Activating Protein 1*). A titre d'exemples, il a été montré que ER interagit avec les protéines Fos et Jun au niveau des sites de liaison d'AP-1 *via* le complexe protéique p160 (Webb et al., 1999). Les gènes ainsi activés sont ceux qui codent pour IGF-1 (*Insulin Growth Factor 1*) (Umayahara et al., 1994), la collagénase (Webb et al., 1995), et la Cycline D1 entre autres (Sabbah et al., 1999). SP-1 quant à lui interagit avec ERα pour activer la transcription de gènes pro-prolifératif et impliqués dans la résistance à l'apoptose. L'on note ceux qui codent pour c-Myc, la Cycline D1 et des protéines de la famille Bcl-2 (O'Lone et al., 2004). Il existe par ailleurs d'autres facteurs de transcription tels que GATA1 et STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription* 5) avec lesquels ERα interagit (Björnström and Sjöberg, 2005).

L'activité des ERs dans la voie génomique indirecte est dans plusieurs cas dépendant de la nature du récepteur (ER α ou ER β). En effet, en présence d'œstrogène, ER α active la transcription de gènes sur les sites de liaison d'AP-1 alors que ER β n'a pas d'activité coactivatrice (Paech et al., 1997).

c) La voie indépendante des œstrogènes

L'activité des récepteurs aux œstrogènes peut être modulée par d'autres signaux que l'E₂ (Figure 13C). Cela est notamment possible grâce au domaine de transactivation AF-1 qui est indépendant du ligand. La phosphorylation des récepteurs aux œstrogènes sur des résidus sérine et tyrosine, ou de leurs corégulateurs, représente l'un des déclencheurs d'activation des ERs. Cette phosphorylation est induite soit par des protéines kinase de type A et C (PKA, PKC), soit par des régulateurs du cycle cellulaire, des neurotransmetteurs, ou encore des facteurs de croissance tels que EGF (*Epidermal Growth Factor*), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor*), TGFβ (*Transforming Growth Factor*) (Vrtačnik et al., 2014).

Un des sites majeurs de phosphorylation sur ERα est la sérine 118 (Bunone et al., 1996) qui, une fois phosphorylée, va permettre la localisation d'ERα au niveau de plusieurs promoteurs de gènes cibles pour activer leur transcription (Weitsman et al., 2006).

2) La voie non génomique

L'idée de l'existence d'une voie non génomique médiée par les œstrogènes a émergé du fait que certains changements induits par les œstrogènes sont trop rapides pour être associés à la transcription de gènes cibles (Pietras and Szego, 1977). L'existence d'une voie non génomique a alors été suggérée. En effet, les actions non génomiques sont communes aux hormones stéroïdiennes et sont généralement associées à l'activation de différentes cascades de protéines kinases, pouvant éventuellement entraîner des modifications indirectes de l'expression génique en raison de la phosphorylation de facteurs de transcription. Bien que ERα ait longtemps été décrit comme un facteur de transcription se liant directement à l'ADN, des études ont montré qu'un sous-ensemble d'ERa, localisé à la membrane plasmique, est impliqué dans des cascades de signalisations extranucléaires (Figure 13D). Une des interactions les plus décrites est l'interaction $ER\alpha/Src$ qui intervient rapidement après stimulation aux œstrogènes (Cabodi et al., 2004) permettant ainsi l'activation de Src (Song et al., 2004). Src est une tyrosine kinase qui va à son tour phosphoryler RAS. Cette cascade d'activation induit l'activation de MEK qui va directement phosphoryler ERK1/2. ERK1/2 phosphorylée va migrer dans le noyau afin d'activer des gènes associés à la prolifération tels que CCND1 (Zassadowski et al., 2012).

Par ailleurs, il a été montré que sous E_2 , ER α interagit rapidement avec la sous-unité régulatrice (p85) de la PI3 kinase (PI3K) (Simoncini et al., 2000). Cette interaction a pour conséquence l'entrée des cellules en phase S, et l'activation de la Cycline D1 (Cabodi et al., 2004; Castoria et al., 2001). Il y a quelques années, notre équipe a étudié la formation du complexe ER α /PI3K/Src dans une cohorte de 175 tumeurs mammaires et a montré que l'activation de ce complexe, *via* Akt, était corrélée à un mauvais pronostic et un faible taux de survie sans rechute (Poulard et al., 2012).

56

IV- Les modifications post-traductionnelles des ERs

De manière générale, les modifications post-traductionnelles (PTM) constituent un des mécanismes les plus importants de la synthèse protéique qui favorisent la variété du protéome. En effet, ces modifications permettent d'assurer la localisation cellulaire (membranaire, cytoplasmique et nucléaire) mais aussi de conférer aux protéines des fonctions biologiques. Des études sur les modifications post-traductionnelles d'ERα ont permis de mieux comprendre les fonctions qui y sont associées (Tableau 5), ce qui constitue un progrès important dans le développement des thérapies ciblées dans le cancer du sein. De nombreuses modifications post-traductionnelles ont été décrites (Figure 14), et parmi elles l'on retrouve celles qui régulent la voie génomique et celles qui régulent la voie non-génomique.

AA	Modifications	Activateur	Enzymes	Fonctions	
Y52	Phosphorylation	Ligand indépendant	c-Abl	Active la stabilité, transcription	
S102	Phosphorylation	Constitutive, E2	GSK3	Active la transcription	
S104/	Phosphorylation	Constitutive, E2	GSK3	Active la transcription	
106		Constitutive, E2, Tam	CycA/Cdk2	Active la transcription	
		E2, Tam, ICI, PMA	МАРК	Active la transcription	
		E2	МАРК	Dimérisation	
S118	Phosphorylation	E2, Tam, ICI	ND	Active la transcription	
		EGF, IGF-1	МАРК	Active la transcription	
		E2	Cdk7	Active la transcription	
		ND	МАРК	Active l'épissage de l'ARN	
		E2	GSK3	Active la transcription	
		E2	ΙΚΚα	Active la transcription	
		Prolactine	ND	Active la transcription	
		ROS	МАРК	Sous-régulation	
		E2	МАРК	Dimérisation	
S154	Phosphorylation	Constitutive, E2, EGF	ND	ND	
S167	Phosphorylation	Constitutive	Akt	Active la transcription	
		ROS	Akt	Sous-régulation	
		EGF	p90 RSK	Active la transcription	
		Insuline, PMA	S6K1	Active la transcription	
		ND	Akt	Active la stabilité	
S236	Phosphorylation	Constitutive	РКА	Inhibe la dimérisation	
Y219	Phosphorylation	ND	c-Abl	Active la dimérisation, la liaison à l'ADN, la	
				stabilité et la transcription	
R260	Méthylation	E2	PRMT1	Voies non génomiques	
K235	Méthylation	E2	G9a	Active la transcription, la liaison à l'ADN	
K266	Acétylation	E2	p300	Active la transcription	
	Sumoylation	E2, Tam	SUMO-1	Active la transcription, la liaison à l'ADN	
K268	Acétylation	E2	p300	Active la transcription	
	Sumoylation	E2, Tam	SUMO-1	Active la transcription, liaison à l'ADN	
S282	Phosphorylation	E2	CK2	Inhibe la transcription	
S294	Phosphorylation	E2	ND	Active la transcription	
K299	Acétylation	Constitutive	p300	Inhibe la transcription	
	Sumoylation	E2, Tam	SUMO-1	Active la transcription, la liaison à l'ADN	
K302	Acétylation	Constitutive	p300	Inhibe la transcription	
	Sumoylation	E2, Tam	SUMO-1	Active la transcription, la liaison à l'ADN	
	Ubiquitinylation	Constitutive, E2, ICI	Ubiquitine	Dégradation protéosomale	
	Méthylation	Constitutive	SET7	Active la stabilité	
K303	Acétylation	Constitutive	p300	Inhibe la transcription	
	Sumoylation	E2, Tam	SUMO-1	Active la transcription, la liaison à l'ADN	
	Ubiquitinylation	Constitutive, E2, ICI	Ubiquitine	Dégradation protéosomale	
S305	Phosphorylation	ND	PAK1	Active la transcription	
		ND	РКА	Active la transcription	
		ND	Akt	Résistance aux anti-aromatase	
		Tam	ικκβ	Active la transcription	
T311	Phosphorylation	E2	р38-МАРК	Localisation nucléaire	
C447	Palmitoylation	Constitutive	PAT	Localisation à la membrane plasmique	
Y537	Phosphorylation	E2	CU kinase	Liaison de l'E2	
		Constitutive	Src	Dimérisation, liaison à l'ADN	
		Constitutive	Src	Liaison de l'E2	
		EGF	EGFR	Prolifération	
S559	Phosphorylation	Constitutive	CK2	Inhibe la transcription	

Tableau 5 : Exemples de résidus modifiés d'ERα et leurs fonctions

AA : Acides Aminés, ND : Non déterminé, ROS : Reactive Oxygen Species, CK2 : Casein Kinase 2, PMA : Phorbol Myristate Acetase. Adapté de (Le Romancer et al., 2011; Stender et al., 2017; Zhang et al., 2016)



Figure 14 : Les modifications post-traductionnelles d'ERα. Me : Méthylation, P : Phosphorylation, Ub : Ubiquitination, SUMO : Sumoylation. Les fonctions des modifications sont représentées en vert pour les activations et en rouge pour les inhibitions (Le Romancer et al., 2011).

1) Exemples de PTM qui régulent les voies génomiques d'ERa

a) Phosphorylation

La structure protéique d'ERα possède 14 résidus sérine dans son domaine N-terminal (10, 46, 47, 84, 91, 102, 104, 106, 118, 137, 154, 167, 173 et 178) (Anbalagan and Rowan, 2015) dont 5 résidus (102, 104, 106, 118, 167) identifiés préalablement comme des sites de phosphorylation pour de nombreuses kinases (Le Romancer et al., 2011), ainsi que des sites de phosphorylation sur des résidus thréonines et tyrosines.

La phosphorylation de la sérine 118, décrite précédemment, est activée par la voie MAPK/ERK1/2 en absence d'œstrogène, ce qui aboutit à une activation de la transcription par ER α (Bunone et al., 1996). Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation de la sérine 118 pouvait être induite par des facteurs tels que l'hypoxie, avec pour conséquence, la prolifération cellulaire, dans le cancer du sein (Park and Lee, 2017). En outre, la phosphorylation des sérines 104, 106, 167 est aussi impliquée dans l'activation de la transcription (Le Romancer et al., 2011). La progression du cancer du sein dépend également de la phosphorylation de la sérine 305 par la cytokine pro-inflammatoire IKK β . En effet, cette enzyme est capable d'activer la transcription ER α -dépendante en présence de tamoxifène et en absence d'oestrogènes (Stender et al., 2017), constituant ainsi l'un des mécanismes de résistance à l'hormonothérapie.

b) Acétylation

L'acétylation d'ERα est principalement médiée par p300, une histone acétyltransférase (HAT) qui, en plus d'acétyler des histones, est capables d'acétyler ERα (Popov et al., 2007). Selon le résidu acétylé, p300 sera considéré, soit comme un coactivateur, soit comme un corépresseur de la transcription médiée par ERα. En effet, lorsque les lysines 302 et 303 sont acétylées par p300, l'activité transcriptionnelle d'ERα est réprimée (Wang et al., 2001) ; alors que l'acétylation des lysines 266 et 268 en présence d'œstrogène, stimule la liaison d'ERα à l'ADN, et par conséquent, son activité transcriptionnelle (Kim et al., 2006).

c) Ubiquitination

L'ubiquitination est le processus selon lequel ER α va subir l'apport d'ubiquitine (Ub), afin d'être pris en charge par le protéasome pour dégradation. Ce processus permet d'assurer un *turnover* du récepteur, afin de réguler l'homéostasie de la cellule, suite aux variations de concentrations du ligand. Les résidus ubiquitinés sont également les lysines 302 et 303 (Berry et al., 2008).

d) SUMOylation

La SUMOylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout de la protéine SUMO (*Small-Ubiquitin-related Modifiers*). En effet, SUMO est un régulateur majeur de la transcription, qui module l'affinité des protéines sur les promoteurs de gènes cibles (Gill, 2004; Hannoun et al., 2010). Ce mécanisme a été décrit pour ER α , il y a quelques années dans notre équipe. En effet, en présence d'œstrogène, ER α est SUMOylé dans sa région charnière (*Hinge*) sur les lysines 266, 268, 299, 302 et 303 par les protéines E3 ligases PIAS1 et PIAS2 (*Protein Inhibitors of Activated STAT*) (Sentis et al., 2005). Ces PTM permettent d'augmenter l'activité transcriptionnelle d'ER α . De par son caractère réversible, la SUMOylation permettrait de réguler l'assemblage de complexes protéiques qui coactivent la transcription avec ER α .

e) Méthylation

ERα est méthylé par la méthyltransférase SET7 sur la lysine 302 (région *Hinge*). Cette méthylation est nécessaire pour le recrutement d'ERα au niveau du promoteur des gènes cibles et, par conséquent, l'activation de la transcription. Ce processus se ferait de manière rapide et transitoire, suivi d'une déméthylation très rapide (Subramanian et al., 2008). Par ailleurs, une étude a montré que la méthylation d'ERα (lysine 235) par l'histone méthyltransférase G9a était associée à l'activité transcriptionnelle d'ERα (Zhang et al., 2016).

2) Exemples de PTM qui régulent les voies non génomiques d'ERa

Tout comme la voie génomique, il existe des modifications post-traductionnelles qui régulent les voies non génomiques d'ERα. Ces modifications assurent la localisation membranaire d'ERα mais aussi les interactions de ce récepteur avec d'autres protéines de la voie non génomique. L'une des modifications d'ERα est la palmitoylation sur la cystéine 447 (Acconcia et al., 2004), qui consiste en l'ajout d'une longue chaîne d'acides gras, permettant ainsi à ERα de s'ancrer à la membrane plasmique et de déclencher les effets rapides des œstrogènes. La phosphorylation d'ERα sur la tyrosine 537 permet son interaction avec le domaine SH2 de Src (Migliaccio et al., 2000). Par ailleurs, notre équipe a montré en 2008, l'importance de la méthylation d'ER α dans l'activation de la voie non génomique par l'œstrogène. En effet, sous stimulation aux œstrogènes, ER α est méthylé sur le résidu arginine 260 par PRMT1 (*Protein arginine [R] MethylTransferase*) (Le Romancer et al., 2008). De plus, ER α méthylé est exclusivement localisé dans le cytoplasme, et cette méthylation constitue un prérequis pour la formation du complexe ER α /Src/PI3K, qui va ensuite activer Akt par phosphorylation, et en conséquence, la prolifération et la survie cellulaire. Par ailleurs, notre équipe a montré que l'histone arginine déméthylase JMJD6 régulait négativement la forme méthylée d'ER α (Poulard et al., 2014).

<u>Chapitre 3 : ERα36</u>

La chronologie de la découverte d'ERa36 a débuté avec l'identification et le clonage d'ERa en 1986, puis de son premier variant d'épissage : ERa46. L'existence d'ERa46 a été suggérée pour la première fois grâce à la présence d'une bande de western blot de 46 kDa, observée avec un anticorps qui cible la forme canonique ERa (Walter et al., 1985). Cette bande de 46 kDa était considérée au préalable comme un produit de la dégradation d'ERa avant d'être reconnue comme un variant d'épissage à la suite de plusieurs études. Quelques années plus tard, l'analyse de protéines extraites à partir d'ostéoblastes a révélé l'existence de bandes ayant une mobilité électrophorétique comprise entre 36-39 kDa et qui pourraient correspondre à un autre variant d'épissage d'ERa (Denger, 2001). C'est en 2005 que Wang et collaborateurs ont cloné pour la première fois la séquence d'ADNc correspondant à ERa36 (Wang et al., 2005). Depuis, ERa36 a fait l'objet de nombreuses études afin d'établir son rôle précis dans le cancer du sein, mais aussi dans d'autres cancers. Dans ce chapitre, seront décrits la structure d'ERa36 ainsi qu'un ensemble de voies de signalisations dans lesquelles ce variant d'épissage est impliqué, mais également un ensemble de modes de régulation d'ERa36.

I- Structure et organisation d'ERα36

1) Structure chromosomique

L'ARNm humain correspondant à ER α 36 est transcrit à partir du gène *ESR1* (décrit dans le chapitre précédent), et résulte d'un épissage alternatif de ce gène. La transcription d'ER α 36 est initiée à partir d'un promoteur, qui était au préalable non identifié, et qui est localisé dans le premier intron du gène *ESR1*. Dans ce premier intron, se trouve un petit exon nouvellement caractérisé et nommé exon **1'**, ceci dans le but de le différencier de l'exon 1 original. A la différence d'ER α , la séquence d'ER α 36 contient dans son ARNm les exons 1', 2, 3, 4, 5, 6 et l'exon 9 (absent dans la séquence d'ER α) qui est localisé plus en aval (Figure 15). Par ailleurs, les exons 7 et 8 ne sont pas épissés (Wang et al., 2005).



Figure 15 : Organisation génique d'ERα36. Le panel supérieur représente la structure (introns et exons) d'ESR1. L'ARNm d'ERα36 est transcrit à partir du nouvel exon 1' localisé dans le premier intron d'ESR1. Adapté de (Wang et al., 2005).

2) Structure protéique

La séquence protéique d'ER α 36 est produite à partir d'une séquence Kozak qui se trouve dans l'exon 2, la même séquence qui sert d'initiation de la synthèse d'ER α 46 (Flouriot et al., 2000). Au niveau de son organisation protéique, ER α 36 est dépourvue des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 mais conserve le DBD, contenu dans la forme canonique ER α , ainsi que le *Hinge* et une partie du LBD. La particularité d'ER α 36 est de posséder une séquence protéique unique (F') de 27 acides aminés dans son domaine C-terminal (CTD) en remplacement de la séquence de 138 acides aminés codée par les exons 7 et 8 d'ER α . La séquence protéique d'ER α 36 contient 310 acides aminés et un poids moléculaire de 36 kDa (Figure 16)



Figure 16 : Structure protéique d'ERα36. Le domaine hachuré F d'ERα36 correspond à une séquence unique de 27 acides aminés. Adapté de (Le Romancer et al., 2011)

3) Régulation de l'expression d'ERa36

L'expression d'ERa36 est régulée par de nombreux facteurs de transcription ainsi que par des protéines qui vont, soit co-activer, soit réprimer sa transcription. Il existe également des facteurs épigénétiques qui modifient l'expression d'ERa36.

a) Régulation du promoteur

Le promoteur d'ER α 36 a été séquencé et cloné pour la première fois en 2009 (Zou et al., 2009). Ce promoteur contient une forte composition en nucléotides G, C, une « TATA box » non canonique, mais ne contient pas de séquences consensus « CCAAT box ». Un nombre important de sites potentiels pour des facteurs de transcription ont été identifiés. Il s'agit de protéines telles que AhR (*Arylhydrocarbone Receptor*), AP-1, SP-1, GR (*Glucocorticoid Receptor*), GATA-1 et c-Jun entre autres (Figure 17).

726	007 1000000		0.00000000	~~~~~~~~~~~	
-/36	GGTACCCGCG	CLUGCGCCGC	CLGTCGGGGT	GUCCUCCUC	CLUGGLAGGA
000	Spi	Spi	SPI	Spi	Spi
-080	GGGAGGGAGG	GAGGGGGGGG	GAAGGGAGAG	CUTAGGGAGE	TGLGGGAGLL
606		spi	Spi	A	LR.
-636	<u>Sp1</u>	CGACCCGAGG	GTGCGCCAGG	GGAGCCC <u>GGG</u>	<u>GCGCGCG</u> GCC TT1
-586	CAGCCCGGGG	GTTC TGCGTG	CAGCCCGCGC	TGCGTTCAGA	GTCAAGTTCT
	Sp1		Sp1	AP1	
-536	CTCGCCG <u>GGC</u>	AGCTGAAAAA	AACGTACTCT	CCACCCACTT	ACCGTCCGTG
		Erg-1		Sp1	
-486	CGAGAGGCAG	ACCCGAAAGC	CCGGGGCTTCC	TAACAAAACA	CAC GTTGGAA
	Sp1				NF-xB
-436	AACCAGACAA	AGCAGCAGTT	ATTTGTGGGG	GAAAACACCT	CCAGGCAAAT
		GA	FA-1 0	IR NF-xB	
-386	AAACACGGGG	CGCTTTGAGT	CACTTGGGAA	GGTCTCGCTC	TTGGCATTTA
	Sp1	ER	AP1		
-336	AAGTTGGGGG	TGTTTGGAGT	TAGCAGAGCT	CAGCAGAGTT	TTATTTATCC
	Sp1		API		TBP
-286	TTTTAATGTT	TTTGTTTAAT	GTGCTCCCCA	AATTTCCTTT	CATCTAGACT
			1	PU.1	
-236	AT TTGATTGG	AAATATGTCA	GCTATGATGA	TGACTTTCTG	GGAAGCGATT
	GATA	-1		Elk-1	
-186	CCTGTCACCC	GCTTT <u>CCCCT</u>	CCTCCCCACC	CCACGTCCTG	GGGCTTTAGA
	GATA-1	5	Sp1	Erg-1	
-136	GAGCGATTGG	GAGTTGAATG	GGTCTGATTT	CGGAGTTAGC	TGGCTGAGTC
22200					c-Jun
-86	CGC GCTGGAG	CGGATTGCTG	GCATGTGACT	T CTGACAGCCO	GAAATTTGT
100000000	Sp1		AP-1	-	
-36	AGGTGTCCCGG	GAGTTTAAA	A CAAGCCATA	T GGAAGCACA	A GTGCTTAAA
	Spl	GR		+1	
+15	AA				

Figure 17 : Mapping de la région 5' d'ERα36 et des sites de co-régulateurs, en amont du site d'initiation de la transcription (+1). D'après (Zou et al., 2009)

b) Protéines corégulatrices de l'expression d'ERa36

b.1) ERα

ERα a été suggéré comme un répresseur de l'expression d'ERα36 pour la première fois en 2005 (Wang et al., 2005). Quelques années plus tard, Zou et collaborateurs ont co-transfecté la séquence promotrice d'ERα36 dans la lignée ERα-négative HEK293 avec ERα et ont montré que ERα régule négativement l'expression d'ERα36, et ce, indépendamment des œstrogènes (Zou et al., 2009).

b.2) WT1

Une étude a identifié WT1 (*Wilm's Tumor suppressor*) comme régulateur négatif de la transcription d'ERα36 par le biais d'approches de *silencing* et d'essais luciférases (Kang et al., 2011a). WT1 existe sous quatre isoformes différentes, et toutes les quatre auraient la capacité d'influencer négativement la transcription d'ERα36. L'analyse du promoteur d'ERα36 a révélé l'existence de deux sites de liaison WT1 (Zou et al., 2009) l'un situé en amont et l'autre en aval de la boîte TATA. De manière intéressante, il a été démontré que WT1 régulait positivement la transcription d'ERα36 (Kang et al., 2011a).

b.3) EGFR

Il a été démontré que la signalisation EGFR régulait positivement l'expression d'ERα36 (Rao et al., 2011). Grâce à des essais luciférases et à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'EGFR, il a été validé que la signalisation d'EGFR avait un effet significatif sur l'activité du promoteur d'ERα36. D'autres analyses utilisant des promoteurs tronqués d'ERα36 ont montré qu'EGFR agissait via un site de liaison à AP-1 dans le promoteur d'ERα-36 (Yin et al., 2014).

66

b.4) HER2

En utilisant le lapatinib, un inhibiteur de HER2, une étude a montré que la signalisation de HER2 pouvait réguler positivement l'activité du promoteur d'ERα36 par l'action d'un site de liaison à AP-1 situé en amont du site d'initiation de la transcription d'ERα36 (Kang et al., 2011b; Rao et al., 2011; Yin et al., 2014).

b.5) BMP2

La protéine BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) a été décrite pour réguler positivement l'expression d'ERα36 dans les cellules MCF-7 (ERα-positives) et MDA-MB-231 (ERα-négatives) par l'activation de la voie Smad (Wang et al., 2012a).

c) Régulation épigénétique d'ERα36

Des facteurs épigénétiques ainsi que des petits ARNs non codant (microARN ou miRNA) sont capables de réguler négativement l'expression d'ERa36. En effet, ERa36 contient, comme beaucoup d'autres protéines, plusieurs sites de fixation de miRNA dans sa région 3'-UTR. Très récemment, une étude a montré que ERa36 était négativement régulée par plusieurs miRNAs dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Thiebaut et al., 2019). Par ailleurs, les auteurs ont montré que l'expression d'ERa36 pouvait être modulée par le niveau de méthylation de son promoteur (Thiebaut et al., 2019).

II- Localisation cellulaire

La localisation cellulaire d'ER α 36 a été étudiée pour la première fois dans la lignée cellulaire HEK293. En effet, Wang et al y ont transfecté ER α 36 puis réalisé un fractionnement cellulaire qui a révélé une proportion importante de ce récepteur au niveau de la membrane plasmique (environ 50%). 40% étaient retrouvés dans le cytosol et seulement 10% dans le noyau (Wang et al., 2006). Quelques années plus tard, avec un anticorps ciblant spécifiquement les 27 acides aminés d'ERα36, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées dans la lignée cancéreuse mammaire MCF-7 et la lignée cancéreuse de l'endomètre (Hec1A). Ces expériences ont montré une co-localisation d'ERα36 avec la Cavéoline-1, une protéine membranaire (Lin et al., 2010). De plus, des expériences d'immunohistochimie dans des cohortes de tumeurs mammaires ont révélé que la localisation d'ERα36 était majoritairement extranucléaire (Lee et al., 2008; Vranic et al., 2011). D'autres mécanismes permettent d'expliquer la localisation extranucléaire d'ERα36.

1) Myristoylation d'ERα36

ERα36 contient dans sa structure protéique, 3 sites potentiels de myristoylation qui sont conservés dans ERα. Il s'agit des résidus 25-30 (GVWSCE), 76-81 (GMMKGG) et 171-176 (ELLTNL) (Wang et al., 2005). La myristoylation étant une PTM permettant l'ancrage à la membrane plasmique, il est fortement suggéré que cette modification soit impliquée dans la localisation membranaire d'ERα36.

2) Interaction avec GP96

GP96 est une protéine majeure du réticulum endoplasmique, appartenant à la famille des Hsp90 et qui, dans certains cancers tels que le foie, transloque au niveau de la membrane plasmique (Hou et al., 2015a). Une étude a par ailleurs montré que cette protéine interagissait avec ERα36. En effet, l'invalidation de GP96 entraîne une perte de stabilité d'ERα36 qui est dégradé par le protéasome ainsi qu'une perte de la localisation membranaire d'ERα36 (Hou et al., 2015b).

3) Export nucléaire d'ERα36

Notre équipe s'est focalisée sur un potentiel rôle des 27 acides aminés C-terminaux d'ERα36 dans sa localisation cellulaire. En effet, cette séquence de 27 acides aminés est riche en résidus leucine. La composition en résidus leucine, correspond à un signal d'export nucléaire (NES) déjà étudié il y a plusieurs années dans la protéine p53 (Stommel et al., 1999).

En transfectant dans la lignée MCF-7 des constructions dans lesquelles ERα36 était, soit dépourvu de son CTD, soit modifié dans certains résidus des 27 acides aminés, ERα36 était relocalisé du milieu extranucléaire au noyau (Omarjee et al., 2017). Ainsi, ces travaux montrent que ERα36 est principalement localisé à l'extérieur du noyau.

III- Voies de signalisation

Certaines études ont suggéré que ERa36, dépourvu d'activité transcriptionnelle intrinsèque, inhibait fortement l'activité de transactivation médiée par les domaines AF-1 et AF-2 d'ERa (Wang et al., 2006). En conséquence, ER α 36 agirait comme un dominant négatif naturel de la signalisation génomique des œstrogènes. ERa36 est capable de former un hétérodimère avec ERα, ce qui peut bloquer l'activité transcriptionnelle d'ERα (Wang et al., 2005). Grâce à la présence de DBD dans sa séquence, ERa36 peut se lier aux mêmes ERE que ERa et entrer en compétition avec celui-ci pour la liaison à l'ADN (Wang et al., 2005). En raison de l'absence des deux domaines d'activation de la transcription (AF-1 et AF-2) requis pour la voie génomique, et en raison de sa localisation membranaire et cytoplasmique, ERa36 est principalement impliqué dans la voie non génomique du cancer du sein. Les effets physiologiques résultant de l'activation membranaire d'ER α 36 peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre, mais le mécanisme d'action semble utiliser des voies similaires, telles que l'activation de diverses protéines kinases et phospholipases. Ces réponses rapides ont un impact sur la prolifération cellulaire et la signalisation apoptotique. De nombreuses études ont montré que l'activation de la voie non génomique médiée par ER α 36 était dépendante des œstrogènes mais plusieurs autres études ont montré l'activation d'ER α 36 par le tamoxifène (Shi et al., 2009; Wang et al., 2018, 2006).
1) La voie MAPK/ERK

L'activation de la voie MAPK/ERK par les œstrogènes est l'une des plus importantes et les plus étudiées de la signalisation non génomique. Une étude a montré l'activation d'ERK1/2 par phosphorylation, en transfectant les cellules HEK293 avec ER α 36 et en présence d'E₂ (Wang et al., 2006).

Quelques années plus tard, une autre équipe a montré que ERα36, activait de manière œstrogèno-dépendante, la voie MAPK/ERK *via* la kinase PKCδ dans des cellules cancéreuses endométriales (Tong et al., 2010).

La Synucléine gamma a été identifiée comme un gène spécifique du cancer du sein, qui participe à un complexe composé de plusieurs protéines chaperonnes incluant Hsp90. Il a été montré que la Synucléine gamma augmentait de manière significative l'activation de ERK1/2 dans les cellules MCF-7, *via* une interaction avec ER α 36 en présence d'E₂ (Shi et al., 2010).

Par ailleurs, une étude a montré que l'activation de la voie MAPK/ERK *via* ERα36, en présence d'œstrogène ou de tamoxifène, entraîne la migration de cellules cancéreuses mammaires (Chaudhri et al., 2012).

Il y a quelques années, notre équipe a étudié les mécanismes moléculaires médiés par ER α 36. En effet, en traitant aux œstrogènes des lignées tumorales mammaires triple négatives, ER α 36 interagit rapidement et fortement avec P-ERK2 (ERK2 phosphorylée), empêchant ainsi la déphosphorylation d'ERK2 par la phosphatase MKP3 (Omarjee et al., 2017). La conséquence de cette interaction est une activation de la Paxilline (Pax) qui va transloquer dans le noyau pour l'activation de la Cycline D1, elle-même impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Figure 18). De manière intéressante, notre équipe a montré que l'interaction ER α 36/P-ERK2 se faisait *via* les 27 acides aminés d'ER α 36 qui possèdent un *D-domain*.

Parallèlement à l'induction de la Cycline D1, il a été rapporté que ER α 36 était capable d'induire la transcription de l'oncogène c-Myc. Cette induction dépend de l'activation de ERK par ER α 36. Ainsi, les cellules MDA-MB-436, dans lesquelles ER α 36 est inhibé, ont perdu l'activation de c-Myc, dépendante d'E₂ (Guo et al., 2013a; Lin et al., 2010).

70



Figure 18 : Mécanisme d'activation de la voie MAPK/ERK par ERα36. Dans la lignée HBCc-12A (triple négative), E₂ active ERα36 qui va rapidement s'associer à Src pour activer MEK puis ERK2. ERK2 phosphorylée (P) va activer la paxilline (PXN) qui va transloquer dans le noyau pour activer la Cycline D1 (Omarjee et al., 2017).

2) La voie Src

Outre la capacité d'ER α 36 à s'associer physiquement à Src de manière dépendante des œstrogènes (Gu et al., 2014), il a été rapporté que ER α 36 induisait la phosphorylation de Src sur la tyrosine 416 pour l'activer (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2011). En outre, d'autres ligands d'ER α 36, tels que le tamoxifène et le fulvestrant induisent également, *via* ER α 36, la phosphorylation de Src sur la tyrosine 416. L'activation de Src via ER α 36 a été démontrée à la fois dans les cellules MCF-7 (ER α -positives), ainsi que dans les cellules MDA-MB-231 et SKBR3 (ER α -négatives) (Zhang et al., 2012).

3) Relations fonctionnelles avec EGFR

Il a été décrit que ERα36 était impliqué dans l'activation la voie d'EGFR en induisant la phosphorylation d'EGFR sur la tyrosine 845 après traitement aux œstrogènes ou au tamoxifène. ERα36 agit sur EGFR en activant Src, ce qui conduit à la phosphorylation et à l'activation d'EGFR. En outre, il a été suggéré l'existence d'une « boucle » de rétroaction positive entre EGFR et ERα36.

En effet, lorsque ERα36 est inhibé, il se produit une diminution significative de la protéine EGFR sans aucune modification des niveaux d'ARNm d'EGFR. Par conséquent, ERα36 stabilise EGFR en empêchant sa dégradation (Zhang et al., 2011).

4) Activation des facteurs de l'EMT (*Epithelial to Mesenchymal Transition*)

Dans les cellules triple négatives de cancer du sein HCC38, l'activation de la voie PI3K/AKT/PKC par ER α 36 et en présence d'E₂-BSA, entraîne la stimulation de l'expression des facteurs métastatiques de l'EMT : Snail1, CXCR4, RANKL, concomitante à la perte d'expression de l'E-Cadhérine. Cette perte d'expression conduit à une augmentation de la survie, de la prolifération et du potentiel métastatique. En effet, le prétraitement des cellules HCC38 avec un anticorps qui neutralise ER α 36, inhibe l'expression de Snail1, en présence d'E₂-BSA (Chaudhri et al., 2012).

5) La voie SphK1/S1P

Les sphingolipides sont des lipides complexes ayant, non seulement un rôle dans la structure membranaire des cellules mais aussi des fonctions biologiques à travers des voies de signalisations cellulaires. En effet, SphK1 (Sphingosine Kinase 1), qui est une protéine de mauvais pronostic, va phosphoryler la sphingosine, son substrat, en S1P (Sphingosine-1-Phosphate) qui va elle-même réguler de nombreux mécanismes tels que la progression du cycle cellulaire entre autres (Andrieu et al., 2017).

Des études ont montré que SphK1 est activée par E₂ dans le cancer du sein avec pour conséquence l'activation de voies de signalisations de type non génomique. Ce mécanisme a été élucidé dans des lignées cancéreuses mammaires triple négatives, montrant que E₂ tout comme le tamoxifène, activent ERα36, qui va activer SphK1. SphK1 à son tour va phosphoryler S1P qui va se lier à son récepteur S1PR pour assurer la survie cellulaire dans le cancer du sein (Maczis et al., 2018).

IV- ERα36 et cancers

Plusieurs études ont montré le rôle d'ERα36 dans plusieurs cancers, notamment le cancer du sein où il est le plus étudié, mais aussi les adénocarcinomes pulmonaires, les cancers gastriques, les carcinomes rénaux et le cancer colorectal entre autres. Concernant l'expression d'ERα36 dans la glande mammaire normale, très peu de données sont connues à ce jour. Cependant, une récente étude a montré que la surexpression d'ERα36 dans la lignée mammaire non transformée (MCF-10A), ainsi que dans des modèles *in vivo*, entraînait une transformation néoplasique associée à une résistance à l'apoptose (Thiebaut et al., 2017).

1) ERα36 dans le cancer du sein

La présence ou l'absence d'ER α dans le noyau constitue un biomarqueur pertinent pour adapter les traitements aux patientes atteintes d'un cancer du sein. Comme indiqué précédemment (chapitre 1), les cancers du sein sont classés selon ce biomarqueur en ER α positifs et ER α négatifs. Environ 80% des cas de cancer du sein sont positifs pour ER α et environ 20% sont négatifs. Le récepteur ER α 36 quant à lui est exprimé à la fois dans les cancers ER α -positifs et ER α -négatifs, à une proportion qui varie entre 40 à 50% selon les études de cohortes (Lee et al., 2008; Shi et al., 2009; Wang et al., 2018).

a) ERa36 et cancers du sein ERa-positifs

Les tumeurs ER α -positives sont généralement bien différenciées sur le plan histologique, et les patientes avec des tumeurs ER α -positives ont un meilleur pronostic car elles répondent bien à l'hormonothérapie par un traitement anti-œstrogénique (principe de l'hormonothérapie). Cependant, la signalisation rapide des œstrogènes médiée par ER α 36 est insensible aux anti-œstrogènes (Wang et al., 2006). En effet, comme indiqué précédemment, ce mécanisme se produit parce que ER α 36 intervient également dans les activités agonistes du tamoxifène en activant plusieurs voies de signalisation dans les cellules cancéreuses du sein et de l'endomètre (Shi et al., 2010; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2012).

Dans les cellules exprimant ERα36, le tamoxifène, même à faible concentration, est capable de stimuler la prolifération cellulaire.

Depuis la découverte de l'activité agoniste du tamoxifène, plusieurs études ont été menées afin de déterminer précisément comment cette activité expliquerait les résistances à l'hormonothérapie. En 2009, l'une des premières études cliniques sur la valeur pronostique d'ERa36 a montré que chez les patientes atteintes de tumeurs du sein ERa-positives et traitées au tamoxifène, l'expression d'ER α 36 était associée à un faible taux de survie (Shi et al., 2009). Au niveau moléculaire, des études ont montré que le tamoxifène induisait l'expression d'une boucle de régulation positive entre ERa36 et HER2. En effet, ERa36 régule positivement l'expression de HER2, tandis que, comme indiqué précédemment, HER2 régule positivement l'activité du promoteur d'ERa36 via un site AP-1 situé dans la région promotrice d'ERa36 (Yin et al., 2014, 2015). Par conséquent, l'expression élevée de la boucle ERα36/HER2 est l'un des mécanismes par lequel les cellules de cancer du sein ER_α-positives échappent au traitement par le tamoxifène. En outre, le rôle d'ER α 36 dans la progression tumorale des cellules souches cancéreuses mammaires (bCSC : breast Cancer Stem Cells) a été identifié. En effet, ERa36 est surexprimé dans la lignée SKBR3, positive pour le marqueur de cellules souches cancéreuses : ALDH1 (Su et al., 2014). De plus, en présence de tamoxifène, ER α 36 active la voie Akt qui va permettre la résistance des bCSC ERα-positives (Deng et al., 2014). Plus récemment, une étude a montré que le tamoxifène se liait directement à ER α 36 entraînant sa phosphorylation.

ERα36 phosphorylé va ensuite transloquer dans le noyau et activer la transcription d'*ALDH1*; ALDH1 qui, à son tour va réguler positivement la prolifération des cellules souches cancéreuses mammaires connues pour leur caractère métastatique (Wang et al., 2018). Cette étude est la première qui met en évidence l'activité nucléaire d'ERα36.

b) ERα36 et cancers du sein ERα-négatifs

Comme évoqué précédemment, ERα36 est également exprimé dans les tumeurs mammaires ERα-négatives et serait en partie responsable du caractère agressif de cette sous-catégorie tumorale. Ceci a été suggéré à la suite d'une étude montrant l'activation œstrogénodépendante d'Akt dans la lignée mammaire MDA-MB-231 (ERα-négatives) dans laquelle aucune activité agoniste des œstrogènes n'était attendue en absence d'ERα (Tsai et al., 2001). Par ailleurs, dans une étude parue en 2008, des chercheurs ont montré par immunohistochimie l'expression d'ERα36 dans des lignées cellulaires mammaires ERαnégatives (Lee et al., 2008). Ces données confortent l'idée que la signalisation rapide des œstrogènes observée dans les lignées ERα-négatives pourrait être due à l'action d'ERα36, qui contribuerait au développement et à la progression des cellules tumorales. Il a été démontré que ERα36 active la survie cellulaire et favorise le potentiel métastatique des cancers du sein. En effet, en réponse à E₂, et comme évoqué précédemment, ERα36 est capable d'activer la protéine kinase C (PKC) (Chaudhri et al., 2012; Tong et al., 2010) une protéine bien connue pour favoriser les métastases.

La plupart des cancers étant traités par chimiothérapie, la recherche sur le cancer du sein a porté sur l'association entre l'expression d'ERa36 et les résultats cliniques des patientes atteintes de cancer du sein et traitées par chimiothérapie. Une récente étude réalisée dans des xénogreffes de tumeurs mammaires a montré une forte expression d'ERa36 dans des lignées résistantes au cisplatine. De plus, le cisplatine induit une up-régulation d'ERa36 de manière dose-dépendante qui va activer le complexe pro-tumoral EGFR/HER2/ERK (Zhu et al., 2018b). En conséquence, l'expression d'ERa36 dans les tumeurs constituerait un biomarqueur prédictif de l'efficacité de la chimiothérapie néo-adjuvante.

2) ERα36 et cancers pulmonaires

L'expression d'ERa36 a été évaluée par IHC dans une cohorte de 126 résections tumorales, obtenues à partir de patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires. Dans 92% des cas, une expression élevée d'ERa36 était associée à une métastase ganglionnaire (Zhang et al., 2014) avec pour conséquence un faible pronostic en terme de survie sans rechute (DFS) et de survie globale (OS).

75

3) ERα36 et cancers gastriques

ERα s'est révélé être un marqueur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer gastrique. Des études cliniques ont notamment été réalisées sur l'expression d'ERα36 dans ce cancer. Une étude portant sur 45 patients ayant eu une résection curative du cancer gastrique a montré que l'ARNm d'ERα36 était significativement plus élevé dans les tissus gastriques normaux que dans les tissus cancéreux. De plus, les tumeurs exprimant des taux élevés d'ARNm d'ERα36 présentaient moins de métastases ganglionnaires et de tumeurs de plus petite taille (Wang et al., 2012b).

4) ERα36 et cancers du rein

L'expression d'ERα36 a été étudiée par IHC dans 125 cas de cancer du rein. Les tumeurs rénales péricarcineuses et bénignes présentaient une faible proportion d'ERα36 dont l'expression est cytoplasmique et membranaire. Par ailleurs, une forte expression d'ERα36 était corrélée à un faible taux de survie (Wang et al., 2015).

5) ERα36 et cancers colorectaux

Une étude de l'expression d'ERa36 par RT-qPCR a été réalisée à partir de 35 tumeurs colorectales malignes et les tissus appariés normaux. Les auteurs ont constaté que l'expression d'ERa36 était régulée négativement dans 71% des cancers colorectaux par rapport aux tissus normaux. De plus, l'expression d'ERa36 était inversement corrélée à l'apparition de métastases ganglionnaires (Jiang et al., 2008).

V- Mécanismes de ciblage d'ERα36

Les études mentionnées ci-dessus ont permis de montrer un panel de mécanismes par lesquels ERa36 agit majoritairement comme un oncogène et un facteur de mauvais pronostic, notamment dans le cancer du sein. A ce jour, ERa36 fait toujours l'objet de nombreuses études afin d'être considéré dans la classification moléculaire du cancer du sein à l'instar d'ERa et PR. Plusieurs inhibiteurs ont été criblés et ont démontré leur efficacité pour inhiber ERa36.

1) Le broussoflavonol B

Le criblage de nombreux composés a montré que le broussoflavonol B (5, 7, 3', 4'tetrahydroxy-3-methoxy-6,8diprenylflavone), un produit chimique purifié à partir de l'écorce de mûrier à papier (*Broussonetia papyrifera*), présentait une puissante activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (ER α -négatives)(Guo et al., 2013b). À faible concentration, le broussoflavonol B induit une régulation négative de l'expression d'ER α 36 et induit également l'arrêt des phases G0/G1 et G2/M dans les cellules MDA-MB-231 (Guo et al., 2013a). De plus, il a été montré que le ciblage d'ER α 36 par le broussoflavonol B dans les cellules MCF-7 résistantes au tamoxifène, induisait une dérégulation du complexe ER α 36/EGFR/HER2. Cette dérégulation modifie le phénotype des cellules MCF-7 devenant sensibles au tamoxifène (Yin et al., 2015).

2) L'icaritine

L'icaritine est un flavonoïde isolé de l'herbe chinoise *Epimedium genus*. Comme d'autres flavonoïdes, il a été démontré qu'il exerçait une action semblable à un antagoniste des œstrogènes. Ainsi, une étude a montré que l'icaritine entraîne une dérégulation d'ER α 36 et d'EGFR, associée à l'apoptose, dans les lignées cancéreuses mammaires triple négatives (MDA-MB-231 et MDA-MB-453) (Wang et al., 2017). Les auteurs ont aussi montré que l'icaritine inhibait la voie MAPK/ERK, et l'induction de la Cycline D1 qui se fait par l'action d'ER α 36.

77

3) La cyanidine-3-o-glucoside

La cyanidine-3-o-glucoside (Cy-3-glu) appartient à la famille des anthocyanosides qui sont des pigments naturels des feuilles, des pétales et des fruits. Ce sont des composés connus pour inhiber la croissance et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses du sein. Il a été montré dans une étude que le Cy-3-glu induit l'apoptose de cellules cancéreuses mammaires triple négatives, qui co-expriment ERa36 et EGFR (Wang et al., 2016). En effet, la Cy-3-glu se lie directement au domaine de liaison au ligand (LBD) d'ERa36 et inhibe la signalisation EGFR/Akt *via* la dégradation d'EGFR.

4) L'epigallocatechin-3-gallate (EGCG)

L'EGCG est un dérivé de la catéchine, appartenant à la famille des flavonoïdes et ayant des effets anti-cancers. Une étude a montré que l'EGCG inhibe, *via* ERa36, la croissance de cellules souches cancéreuses mammaires (bCSC) en agissant également sur EGFR. En effet, l'inhibition d'ERa36 par shRNA, associée à un traitement des cellules à l'EGCG n'a pas montré d'effet sur la croissance de ces cellules (Pan et al., 2016).

5) **PRMT2**

Comme indiqué dans le chapitre 2, la protéine arginine méthyltransférase 1 (PRMT1) interagit et méthyle ER α préalablement à l'activation de la voie PI3K (Le Romancer et al., 2008). Une autre PRMT : PRMT2, quant à elle, interagit avec ER α pour inhiber la prolifération cellulaire (Qi et al., 2002). Le rôle antiprolifératif de PRMT2 via l'inhibition d'ER α a laissé suggérer un possible rôle de PRMT2 dans la régulation d'ER α 36. Dans une récente étude, les auteurs ont étudié le rôle de PRMT2 dans les mécanismes de résistance au tamoxifène induits par ER α 36. Ainsi, dans la lignée triple négative MDA-MB-231 qui est résistante au tamoxifène, la surexpression de PRMT2 était associée à une baisse de l'activation des voies MAPK/ERK et PI3K/Akt, tamoxifène-dépendantes (Shen et al., 2018). Les auteurs ont par ailleurs montré que PRMT2 interagit avec ER α 36, cette interaction qui inhiberait l'action agoniste du tamoxifène *via* ER α 36 (Shen et al., 2018).

Chapitre 4 : Structure et rôle du récepteur à la progestérone

La progestérone est une hormone stéroïdienne qui possède une diversité de fonctions biologiques. Elle est synthétisée à partir du cholestérol (Figure 19) et sécrétée principalement par les cellules du corps jaune, contenues dans les ovaires et par le placenta. En effet, la progestérone, fortement sécrétée au cours de la puberté chez la femme, joue un rôle clé dans le développement de l'appareil reproducteur femelle, dans l'établissement des caractères sexuels, ainsi que le maintien de l'embryon dans l'utérus. En plus de ces fonctions dans le développement féminin, la progestérone et les progestatifs de synthèse sont cliniquement utilisés pour la contraception et le traitement hormonal substitutif de la ménopause (HRT : Hormone Replacement Therapy); mais aussi pour traiter plusieurs pathologies chroniques telles que l'endométriose. L'action de cette hormone se fait via son récepteur : le récepteur à la progestérone (PR) qui est, tout comme ER, une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. PR est un régulateur majeur des fonctions reproductrices chez la femme et contrôle le développement, la prolifération, les processus de différentiation au cours du cycle ovarien mais aussi la grossesse. Son action dépend fortement du type cellulaire, et de l'environnement hormonal entre autres, et son expression constitue un biomarqueur prédictif des traitements du cancer du sein. Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons à sa structure ainsi qu'à ses voies de signalisations, en particulier dans le cancer du sein.



Figure 19 : Biosynthèse de la progestérone (Source : Pr. Bertrand PERRET : medecine.ups-tlse.fr)

I- Les isoformes de PR

1) Structure protéique

Le récepteur à la progestérone (PR) a été cloné pour la première fois en 1986 par le groupe d'Edwin Milgrom (Loosfelt et al., 1986). Le gène *PgR* est localisé sur le chromosome 11q22 (Rousseau-Merck et al., 1987) qui contient 2 promoteurs alternatifs qui servent d'initiation à la transcription de deux isoformes de PR : PR-B, la forme *full length* ayant une composition de 933 acides aminés (Figure 20) et PR-A qui possède 769 acides aminés (Kastner et al., 1990; Li and O'Malley, 2003). Ces 2 protéines ont des poids moléculaires d'environ 120 kDa (PR-B) et 94 kDa (PR-A). Un autre promoteur alternatif, plus en aval de la séquence de *PgR*, permet la transcription de PR-C qui a un poids moléculaire d'environ 60 kDa (Wei et al., 1990). De même que les récepteurs stéroïdiens, PR contient dans sa structure les domaines fonctionnels nécessaires à la fixation du ligand (LBD), à la flexibilité du récepteur (*Hinge*), à la liaison à l'ADN (DBD), et à la transactivation de la transcription (AF-1 : ligand-indépendante et AF-2 : ligand-dépendante).

La région AF-1 est impliquée dans des interactions avec des facteurs de transcription et des co-régulateurs transcriptionnels (Lavery and McEwan, 2005). Le domaine AF-2 qui est fortement conservé entre les espèces, est capable de se lier aux motifs LxxLL des coactivateurs de récepteurs stéroidiens (SRCs) de la famille des p160, et au co-régulateur RIP140 (Beato and Klug, 2000; Li and O'Malley, 2003) comme le fait également ER α . La dimérisation du récepteur peut se faire au niveau du DBD qui est aussi impliqué dans des interactions protéines-protéines (Africander et al., 2011). Le domaine *Hinge* contient un signal responsable de la localisation nucléaire de PR (NLS).

80



Figure 20 : Structure et domaines fonctionnels des isoformes de PR. Les chiffres correspondent à la position des acides aminés. AF : Activation Function, DBD : DNA Binding Domain, LDB : Ligand Domain Binding, h : hinge. Adapté de (Li and O'Malley, 2003).

Au niveau structurel, PR-A et PR-B sont identiques dans leurs domaines fonctionnels, mais PR-A ne contient pas les 164 acides aminés N-terminaux, contenus dans PR-B. En effet, la fonction de cette séquence N-terminale de 164 acides aminés, identifiée plus tardivement est un troisième domaine de transactivation de la transcription, nommé AF-3 (ou BUS : *B-Upstream Segment*). L'isoforme PR-C ne contient pas le domaine N-terminal de PR-B, ainsi qu'une partie du domaine zinc finger du DBD. Par conséquent PR-C ne peut se lier à l'ADN et n'aurait pas d'activité transcriptionnelle (Wei et al., 1990). En fonction du contexte cellulaire et du gène ciblé par PR, les domaines AF-1, AF-2 et AF-3 peuvent fonctionner soit de manière indépendante, soit en synergie (Dong et al., 2004; Meyer et al., 1992; Takimoto et al., 2003).

2) Caractéristiques fonctionnelles des isoformes de PR

La différence structurelle entre PR-A et PR-B laisse suggérer une distinction dans leurs fonctions respectives (Tableau 6). L'importance du rôle de PR-A et PR-B a été mis en évidence dans des souris K.O pour l'une ou l'autre de ces 2 isoformes. En effet, dans des souris K.O pour PR-A, aucune incidence sur le développement normal de la glande mammaire n'a été observée alors qu'une extinction de PR-B a montré une carence dans le développement mammaire. Néanmoins, ces expériences d'extinction de PR-A et PR-B ont montré que PR-A jouait un rôle fonctionnel plus important que PR-B dans le développement de l'utérus et des fonctions ovariennes (Fernandez-Valdivia et al., 2005). Au niveau de l'activation des gènes, l'isoforme PR-B est la plus retrouvée sur les promoteurs de gènes cibles, par rapport à PR-A qui, quant à elle est capable de réprimer l'action de PR-B (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993). Par ailleurs, des expériences de microarrays sur des cellules cancéreuses mammaires ont montré que 65 des 94 gènes régulés par PR étaient régulés par PR-B uniquement, alors que seulement 4 gènes étaient régulés par PR-A, le reste étant régulé par les deux isoformes (Richer et al., 2002).

Tissu	Isoformes	Actions de la progestérone sur les isoformes		
	PR-A	-Réprime l'activité transcriptionnelle de PR-B, AR, GR et ER		
Glande mammaire		-Faible activité transcriptionnelle comparée à PR-B		
	PR-B	-Requis pour le développement normal de la glande mammaire non transformée		
		-Action proliférative dans les tumeurs mammaires		
Utérus	PR-A	-Requis pour le développement et la physiologie de l'utérus		
		-Isoforme dominante dans les cellules stromales.		
		-Actions antiprolifératives		
	PR-B	-Isoforme dominante dans les cellules épithéliales glandulaires.		
		-Actions prolifératives dans les cellules cancéreuses endométriales.		
Ovaire	PR-A	-Essentiel pour les fonctions ovariennes		
		-Absent dans les carcinomes ovariens		
	PR-B	-lsoforme exprimée dans les carcinomes ovariens ayant des actions antiprolifératives.		

Tableau 6 : Différences fonctionnelles entre PR-A et PR-B dans divers types tissulaires (Adapté de(Diep et al., 2015).

3) Modifications post-traductionnelles de PR

A l'instar d'ERα, PR est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, et la SUMOylation. En effet, l'action de PR va être considérablement impactée en fonction du résidu modifié. Dans cette partie, nous décrirons les principales modifications post-traductionnelles de PR ainsi que les résidus modifiés.

a) La phosphorylation

PR possède plus d'une dizaine de sites de phosphorylation, principalement localisés dans son domaine N-terminal (Figure 21) qui sont phosphorylés en présence ou en absence de ligand. Les sérines 81, 190, et 400 sont phosphorylées de manière constitutive et leur expression n'est que très peu augmentée en présence de progestérone. Les sérines 102, 162, 294 et 345 sont quant à elles phosphorylées par l'action de la progestérone (Grimm et al., 2016). Plusieurs kinases ont été identifiées comme pouvant phosphoryler PR in vitro (Dressing et al., 2009; Ortí et al., 1992; Vicent et al., 2010). Ces kinases qui ont des sites de phosphorylation différents sont CDK1/2 (Cyclin-Dependent Kinase 1/2), MAPK/ERK, et la caséine kinase 2 (CK2). A titre d'exemples, la sérine 81 est phosphorylée in vitro par CK2 (Zhang et al., 1994), les sérines 162, 294 et 345 sont phosphorylées par MAPK/ERK (Ward and Weigel, 2009), les sérines 25, 162, 190, 213, 400, 554, 676 sont phosphorylées par le complexe Cycline A/CDK2 (Knotts et al., 2001; Zhang et al., 1997). Par ailleurs, la nature et la position du résidu phosphorylé ont diverses conséquences sur l'action de PR. En effet, ces modifications ont un impact sur la localisation cellulaire de PR, sa stabilité, son interaction avec des co-régulateurs, sa fixation à l'ADN, et son activité transcriptionnelle entre autres. La phosphorylation de PR est associée à de nombreuses voies de signalisations.

b) Ubiquitination

A l'instar des autres récepteurs nucléaires, PR est polyubiquitiné par des ubiquitines ligases puis dégradé par le protéasome afin de réguler ses fonctions *via* un *turnover*. La dégradation de PR est à la fois dépendante et indépendante du ligand. En effet, dans les cellules cancéreuses mammaires, la demi-vie de PR, lorsqu'il n'est pas lié à son ligand est d'environ 21h, alors que PR lié à son ligand est dégradé après 6h (Nardulli et al., 1988). Il a été montré par ailleurs que BRCA1, un biomarqueur fondamental du cancer du sein, possède une activité E3 ubiquitine ligase capable d'ubiquitiner PR en présence et en absence de son ligand. De manière intéressante, Calvo et Beato ont montré qu'après traitement à la progestérone, le complexe protéique BRCA1/BARD1 pouvait se fixer à PR au niveau de ses sites de fixation sur la chromatine. Ce complexe protéique catalyse l'ubiquitination de l'histone H2A et contribue au *silencing* épigénétique des gènes cibles de PR, en empêchant le recrutement de l'ARN polymérase II (Calvo and Beato, 2011).

c) SUMOylation

Au contraire d'ERα qui possède plusieurs sites de SUMOylation, PR quant à lui n'en possède qu'un seul, sur la lysine 388 (Figure 21) qui se trouve sans son domaine N-terminal, dont la SUMOylation est dépendante de l'hormone. En effet, la SUMOylation de PR a un effet suppressif de la transcription médiée par PR (Abdel-Hafiz et al., 2002; Chauchereau et al., 2003). De plus, plusieurs modifications ponctuelles de la lysine 388 ont montré une absence de SUMOylation. Ces mutations ponctuelles ont eu pour effet une activation de la transcription PR-dépendante plus importante chez les mutants qu'en condition *Wild-Type* (Abdel-Hafiz et al., 2009).

d) Acétylation

L'acétylation de PR régule fortement son activité transcriptionnelle. Ainsi, un nombre important d'études ont été menées afin d'identifier comment l'acétylation de PR affectait sa liaison à la chromatine. PR possède dans sa séquence protéique, une séquence consensus d'acétylation KxKK localisée au niveau des acides aminés 638-641 (Figure 21) dans la région NLS/*Hinge* (Daniel et al., 2010). Quelques années plus tard, une étude a montré que la lysine 183 de PR est également acétylée par la protéine p300. En effet, l'acétylation de la lysine 183 augmente l'activité transcriptionnelle de PR en permettant une fixation rapide de PR sur le promoteur de ses gènes cibles (Chung et al., 2014a). En fonction du gène régulé par PR, l'acétylation peut soit augmenter, soit réduire l'activité transcriptionnelle PR-dépendante (Daniel et al., 2010).

e) Méthylation

PR possède un site de méthylation localisé au niveau de la lysine 464 (Figure 21). Il a été montré que la méthylation de ce résidu inhibe l'activité transcriptionnelle de PR, médiée par son domaine AF-1. En effet, la mono-méthylation de la lysine 464 empêche le recrutement des co-activateurs NCoR1 et SRC-1 (Chung et al., 2014b).



Figure 21 : Résidus modifiés de PR. En jaune, les sites de phosphorylation, en rouge les sites d'acétylation, en bleu le site de sumoylation, et en orange le site de méthylation. NTD : N-Terminal Domain. Adapté de (Grimm et al., 2016).

II- Voies de signalisation de PR

1) Voie génomique

a) Fixation à la chromatine

Au niveau de l'ADN, PR va recruter des co-régulateurs transcriptionnels via des interactions protéine/protéine, qui vont contribuer aux modifications de l'état de la chromatine, permettant ainsi l'activation ou la répression de certains gènes. L'élément de réponse sur lequel se lie PR est une séquence consensus GGTAACAnnnTGTTCT, commune au récepteur des androgènes (AR) et au récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Lieberman et al., 1993; Lombès et al., 1993), ce qui laisse suggérer d'un potentiel crosstalk entre PR, AR et GR. Des expériences de chIP-seq associées à un profil d'expression génique ont permis de cartographier de nombreux sites de fixation de PR sur le génome de différents types cellulaires et tissulaires. En effet, ces expériences de chIP-seq ont révélé l'existence de 31.457 sites de fixation pour PR dans des cellules cancéreuses mammaires et 7.034 sites dans des cellules de léiomyome utérin (Yin et al., 2012). Parmi les sites de fixation identifiés, le motif le plus enrichi est l'hexanucléotide TGTTCT qui correspond à un PRE (Progesterone Responsive Elements) (Ballaré et al., 2013). Bien que le génome possède plusieurs milliers de sites de fixation pour PR, il n'y a qu'une faible proportion de ces sites qui sont réellement occupés par PR (Ballaré et al., 2013; Rubel et al., 2012). Ainsi, la présence seule d'un PRE ne peut garantir la fixation de PR. L'analyse bioinformatique des PREs a montré un enrichissement, dépendant du type cellulaire de plusieurs facteurs de transcription tels que STAT, FOXA1, SP1 et AP-1 (Clarke and Graham, 2012). Ces facteurs de transcription lient à la fois ER α et PR et créent une dynamique transcriptionnelle autour de ces deux récepteurs, ce qui laisse suggérer l'existence d'un crosstalk que nous verrons par la suite. Une autre protéine : STAT3 interagit avec PR au niveau du promoteur de gènes cibles dans les cellules cancéreuses mammaires. En présence de progestérone ou d'héréguline, un facteur de croissance tumorale, PR et STAT3 s'associent au niveau du promoteur de gènes cibles tels que Bcl-xl, p21/CIP1 et c-Myc dans la lignée T47D (Proietti et al., 2011, 2015).

b) Remodelage de la chromatine

En plus des facteurs « classiques » de transcription qui co-régulent la fixation de PR sur ses éléments de réponse, l'on pourrait suggérer que d'autres facteurs de transcription se lierait à PR afin de permettre le remodelage de la chromatine, comme cela a déjà été décrit pour ER, AR et GR (Zaret and Carroll, 2011). L'analyse par chIP-seq des sites de fixation de PR sur le génome a, par ailleurs montré un enrichissement de nucléosomes.

De manière intéressante, il a été montré que PR pouvait agir en se liant directement aux nucléosomes pour remodeler la chromatine (Ballaré et al., 2013; Beato and Vicent, 2012). La fixation de PR aux nucléosomes est ainsi considérée comme un prérequis à l'activation liganddépendante de gènes cibles. Ce mécanisme de régulation des gènes cibles constitue une différence fonctionnelle importante entre PR et les autres récepteurs nucléaires cités en amont (ER, GR, AR). En effet, après activation par son ligand, PR va remodeler la chromatine en modifiant la position de l'histone H1 et du dimère d'histones H2A/H2B (Ballaré et al., 2013).

c) Actions génomiques de PR en absence de ligand

L'analyse comparative de l'association PR-ligand *versus* PR sans ligand, portant sur la fixation aux éléments de réponse, a révélé que le couple PR-ligand se lie à des PREs différents de ceux ou PR sans ligand se fixe (Ballaré et al., 2013; Yin et al., 2012). De plus, il a été reporté que PR non lié à son ligand est capable de réguler l'expression de gènes cibles en interférant avec l'activation de la transcription ligand-dépendante. En effet, la fixation de PR sans son ligand, au niveau du promoteur de gènes cibles stabilise des complexes de répression de la transcription qui peuvent être « détachés » de la chromatine en présence de progestérone (Vicent et al., 2013).

d) Crosstalk entre PR et d'autres récepteurs nucléaires

Comme indiqué précédemment, PR se lie à la séquence consensus GGTAACAnnnTGTTCT sur laquelle se lie également d'autres récepteurs nucléaires : AR et GR. La compétition pour la fixation à cette séquence consensus est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle. Par exemple, AR et GR inhibe chacune leur activité en formant un hétérodimère au niveau de cette séquence consensus (Chen et al., 1997). De plus, il a été montré que PR également, tout comme AR, est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de GR (Yen et al., 1997).

Un autre aspect des *crosstalks* entre récepteurs nucléaires a été mis en lumière *via* les relations fonctionnelles entre ER α et PR dans le cancer du sein. Historiquement, la présence de PR dans le diagnostic des tumeurs mammaires était corrélée à la présence et au fonctionnement d'ER α , puisque PR est un gène cible d'ER α (Figure 22A). Plus récemment, une étude a montré un autre aspect du rôle de PR. En effet, à partir d'études réalisées dans des modèles précliniques et des lignées cancéreuses mammaires, Mohammed et collaborateurs ont montré qu'en présence d'æstrogène et de progestérone, PR redirige ER α et cofacteurs sur des promoteurs qui régulent des gènes de bon pronostic (Figure 22B) (Mohammed et al., 2015). Ces données confèrent un rôle prépondérant à PR, bien différent du simple fait qu'il est la « vitrine » de l'expression d'ER α .





2) Voie non classique

Contrairement à ERα dont la voie non génomique a été clairement définie, la voie non génomique de PR est plus complexe et difficilement dissociable de la voie génomique, d'où l'appellation « voie non classique ». En effet, une fraction de PR va subir des modifications post-traductionnelles qui vont entraîner la translocation de PR dans le noyau, et PR modifié va activer la transcription de gènes cibles, tels que ceux impliqués dans la prolifération et l'activation du cycle cellulaire.

La phosphorylation de PR est l'une des modifications les plus associées à l'activité transcriptionnelle de PR. Dans cette partie, nous donnerons un aperçu global des interactions cytoplasmiques de PR dans le cancer du sein, ainsi qu'un panel de cascades de signalisation activées par la progestérone.

a) L'interaction PR/Src

La voie non génomique de la progestérone est activée à la membrane plasmique par un sousensemble de PR qui va activer, *via* diverses interactions protéines/protéines, des cascades d'activations cytoplasmiques. L'une des premières cascades décrites est l'interaction de PR avec la tyrosine kinase Src qui active la voie Src/Ras/ERK. En effet, dans la lignée cancéreuse mammaire T47D traitée à la progestérone, PR va au préalable s'associer à ER α qui joue le rôle d'intermédiaire pour l'interaction PR/Src. Cette interaction, l'une des premières décrites, va permettre par la suite d'activer Ras et ERK par des cascades de phosphorylation (Migliaccio et al., 1998). De plus, l'interaction PR/Src se fait au niveau du domaine N-terminal de PR qui est riche en résidus prolines, et qui interagit avec le domaine SH3 de Src (Hill et al., 2012).

b) Rôles de la phosphorylation de PR

De nombreuses études ont montré le rôle de la phosphorylation de PR dans plusieurs mécanismes cellulaires et dans l'activation de gènes cibles. Les rôles de la phosphorylation sont multiples et diffèrent généralement d'un type cellulaire à l'autre. Parmi les protéines qui régulent l'expression de PR, la famille des STATs apparaît comme des cofacteurs primordiaux dans l'action de PR, aussi bien dans la glande mammaire normale non transformée que dans les tumeurs mammaires.

Dans les cellules cancéreuses mammaires, STAT5A est recrutée avec PR sur le promoteur d'un ensemble de gènes cibles impliqués dans la prolifération et les réponses inflammatoires, entre autres (Hagan et al., 2011). Il a été montré que cette association protéique se fixait sur les éléments de réponse de Wnt1, un gène régulé par l'action proliférative de la progestérone et dépendant de la phosphorylation de PR sur la sérine 82 par CK2, et en présence de la protéine DUSP6 (Hagan et al., 2013).

De plus, l'activation de l'expression de STAT5A est aussi dépendante de la phosphorylation de la sérine 81 par CK2. Il est à noter que la nature du résidu phosphorylé conditionne le recrutement de PR et de STAT5A sur la chromatine (Hagan and Lange, 2014).

Dans la lignée mammaire T47D, le traitement à la progestérone provoque la phosphorylation de PR sur la sérine 345, qui est dépendante d'EGFR, Src et MAPK (Faivre et al., 2008). P-PR S345 va ensuite interagir avec le facteur de transcription SP-1 et activer la transcription d'EGFR et p21, un régulateur du cycle cellulaire. Une autre étude portant sur la régulation du cycle cellulaire a été menée pour connaître la cinétique d'activation de PR pendant le cycle. En effet, en réponse à la progestérone, PR est phosphorylé durant la phase S du cycle cellulaire, sur les sérines 294, 345 et 400 par MAPK et CDK2 puis induit l'activation de la Cycline D1 (Dressing et al., 2014). De plus, la Cycline D1 va interagir avec P-PR S345 et SP-1 sur le promoteur de HSPB8 (Dressing et al., 2014), une protéine chaperonne impliquée dans le processus migratoire des cellules cancéreuses mammaires (Piccolella et al., 2017) et fréquemment associée à la résistance au tamoxifène.

En plus d'être impliquée dans la progression du cycle cellulaire, la phosphorylation de PR joue aussi un rôle important dans le développement des cellules souches cancéreuses mammaires. Knutson et collaborateurs ont montré que le facteur de croissance EGF induit la phosphorylation de PR (Sérine 294), qui, à son tour active l'expression de gènes tels que *HER2*, *PAX2, AHR, AR, RUNX2,* qui maintiennent le caractère dédifférencié des cellules souches cancéreuses (Knutson et al., 2017).

En conclusion, la phosphorylation de PR est impliquée dans un nombre très important de mécanismes ayant pour conséquence le développement du cancer du sein *via* la progression du cycle cellulaire, le maintien du caractère dédifférencié des cellules souches cancéreuses, et la résistance au tamoxifène *via* HSPB8. En fonction du contexte cellulaire, PR va être phosphorylé sur des sites différents et cette signature post-traductionnelle va permettre de rediriger PR et ses cofacteurs au niveau de sites généralement différents des PREs classiques.

De plus, des études ont montré qu'en fonction du contexte cellulaire, la phosphorylation de PR est associée à d'autres modifications telles que la SUMOylation, l'ubiquitination et l'acétylation (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014).

92

3) Régulation de PR par les micro-ARNs (miRNAs)

Comme mentionné dans le chapitre 1, l'expression de PR dans le cancer du sein est généralement associée à un bon pronostic et est attribuée à l'activité transcriptionnelle d'ERα. De nombreuses études ont montré que l'expression de PR était régulée par plusieurs miRNAs. Ainsi, la détection des miRNAs qui ciblent les biomarqueurs tumoraux tels que PR, constitue un moyen de prédire le pronostic de la maladie.

Les miRNAs sont des petits ARNs de 20 à 25 nucléotides, qui ciblent des ARNm dans leur région 3'-UTR, afin d'induire la dégradation de ces ARNm et d'inhiber le processus de traduction (Bartel, 2009). Ces petits ARNs jouent un rôle fondamental dans de nombreux mécanismes biologiques et sont parfois anormalement exprimés dans plusieurs cancers tels que le cancer du sein. Les miRNAs fonctionnent par conséquent comme des régulateurs de la progression tumorale. Les ARNm peuvent être ciblés par plusieurs miRNAs différents afin de réguler leur expression. PgR contient une importante région 3'-UTR de 9.492 nucléotides (Maillot et al., 2009) contenant plusieurs sites putatifs de miRNAs qui ont été extensivement étudiés. Des essais luciférase effectués dans la lignée MCF-7 ont montré que les miR-181a, -23a, et -26b se liaient sur l'ARNm de PR. En effet, une surexpression de ces miRNAs réduisait fortement l'expression de PR (Gilam et al., 2017). De manière intéressante, Gilam et collaborateurs ont montré par IHC que les miR-181a et -26b était surexprimés dans des tissus cancéreux mammaires (Gilam et al., 2017). Quelques années plus tôt, à partir d'une étude de 453 miRNAs dans une cohorte de 29 tumeurs mammaires, Lowery et collaborateurs ont montré que PR était négativement régulé par plusieurs miRNAs notamment le miR-520g, dont l'expression a été confirmée dans une cohorte plus importante (Lowery et al., 2009). Par ailleurs, l'expression E2-dépendante de PR entraîne un mécanisme de régulation par lequel PR va activer l'expression du miR-513a-5p (Figure 23) qui va se fixer sur la région 3'-UTR de PR et ainsi down-réguler son expression (Cochrane et al., 2012; Muti et al., 2018). Ce modèle de régulation est un moyen par lequel PR assure son turnover. Il a été indiqué précédemment que la dégradation de PR, 6h post-traitement à la progestérone, était due à son ubiquitination puis à sa dégradation par le protéasome (Nardulli et al., 1988). Une étude plus récente a proposé un autre mécanisme de dégradation par lequel la progestérone induit l'expression du miR-129-2 qui va directement se lier à PR (Godbole et al., 2017).

93



Figure 23 : Modèle d'inhibition de l'expression de PR par le miR-513a-5p (Cochrane et al., 2012)

Objectifs de la thèse

Depuis la découverte des récepteurs ER et PR, la classification moléculaire des cancers du sein a longtemps été basée sur leur expression, afin de déterminer la stratégie thérapeutique à adopter pour les femmes atteintes de cancers du sein. Cependant, l'identification d'ERa36 en 2005 ainsi que sa caractérisation dans le cancer du sein, a permis de mieux comprendre ses voies de signalisation, et ERa36 apparaît désormais comme un nouveau marqueur moléculaire. Il y a quelques années, notre équipe a étudié les voies de signalisations d'ER α 36 dans des lignées cancéreuses mammaires, démontrant que ERa36 activait des biomarqueurs de prolifération tels que MAPK/ERK, Cycline D1. Par ailleurs, nous avons étudié son expression ainsi que sa valeur pronostique dans deux cohortes de tumeurs mammaires, fournies par le Centre Léon Bérard de Lyon. Comme déjà révélé, nous avons observé dans nos cohortes d'étude que l'expression d'ERa36 était significativement corrélée à de faibles taux de survies (survie sans rechute, survie sans métastases, survie globale). La valeur pronostique d'ERα36 a parallèlement été étudiée dans des sous-catégories tumorales, exprimant ou non les biomarqueurs ERα et PR. Dans les sous-catégories PR-positives et PR-négatives, nous avons observé une différence significative dans la valeur pronostique d'ERα36. En effet, de manière intéressante, la faible valeur pronostique d'ERa36 était retrouvée uniquement dans la souscatégorie PR-positive, mais pas dans la sous-catégorie PR-négative. Ainsi, ces résultats ont laissé suggérer que ERα36 pourrait interférer avec les voies de signalisations de PR.

Basé sur ces informations, l'objectif de ce travail a été de caractériser les potentielles relations fonctionnelles entre ERα36 et PR, ainsi que la signification biologique de cette cross-régulation dans le cancer du sein.

Résultats

ERa-36 regulates progesterone receptor activity in breast cancer

Henri-Philippe Konan^{1,2,3}, Loay Kassem⁴, Soleilmane Omarjee^{1,2,3,5}, Ausra Surmieliova-Garnès^{1,2,3}, Julien Jacquemetton^{1,2,3}, Elodie Cascales⁶, Amélie Rezza⁶, Olivier Trédan^{1,2,3,7}, Isabelle Treilleux^{1,2,3,8}, Coralie Poulard^{1,2,3} and Muriel Le Romancer^{1,2,3}

1 Université de Lyon, F-69000 Lyon, France.

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

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

4 Clinical Oncology Department, Faculty of Medicine, Cairo University, Cairo, Egypt.

5 Cancer Research UK, Cambridge Institute; University of Cambridge CB2 0RE, United Kingdom.

6 GenOway, Lyon, 69007, France.

7 Centre Léon Bérard, Medical Oncology Department, F-69000 Lyon, France.

8 Centre Léon Bérard, Pathology Department, F-69000 Lyon, France.

Address for all correspondence and requests for reprints to: Muriel Le Romancer, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM 1052, CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Bâtiment D, 28 rue Laennec, 69373 Lyon Cedex 08, France. Tel: 00 33 4 78 78 28 22. Fax: 00 33 4 78 78 27 20. E-mail: <u>muriel.leromancer@lyon.unicancer.fr</u>

Abstract

Alterations in estrogen and progesterone signaling, via their respective receptors, estrogen receptor alpha (ER α) and progesterone receptor (PR), are largely involved in the development of breast cancer (BC). The recent identification of ER α -36, a splice variant of ER α , has uncovered a new facet of this pathology. Although, ER α -36 expression is associated with poor prognosis, metastasis development and resistance to treatment, its predictive value has so far not been associated with a BC subtype and its mechanisms of action remain understudied. Here, we demonstrate that ER α -36 expression at the plasma membrane is correlated with a reduced disease-free survival in a cohort of 160 BC patients, particularly in PR-positive tumors, suggesting a crosstalk between ER α -36 and PR. Indeed, we show that ER α -36 interacts constitutively with PR in the nucleus of tumor cells. Moreover, it regulates its expression and phosphorylation on key residues. ER α -36 is thus a regulator of PR signaling, impacting its transcriptional activity and progesterone-induced anti-proliferative effects. Hence, ER α -36 may constitute a new prognostic marker in PR-positive BC.

Keywords:

Breast cancer, ERa-36, progesterone receptor, transcription, biomarker.

1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most common cancer among women worldwide. More than 75% of breast tumors express the estrogen receptor α (ER α) in the nucleus and predominantly belong to the luminal subtype. ERa plays a major role in BC tumorigenesis as it regulates cell cycle, cell survival and angiogenesis [1]. Interfering with the ER α pathway using anti-estrogens (either selective estrogen receptor modulators, such as tamoxifen, or selective estrogen downregulators, such as fulvestrant) or through estrogen deprivation (e.g., aromatase inhibitors), increases the survival of ER α -positive BC patients. Despite the high level of sensitivity of luminal tumors to endocrine therapy, treatment efficacy is limited by intrinsic and acquired resistance [2, 3]. Indeed, 30-50% of patients relapse in the adjuvant setting and eventually die following the development of metastases [2, 4]. More recently, ERa-36, a splice variant of ERa was identified as a novel actor of breast tumorigenesis. ER α -36 is encoded by the *ESR1* locus, transcribed from a promoter located in the first intron, resulting in a shortened receptor. ERa-36 retains the DNA binding domain, but lacks both transactivation domains, AF-1 and AF-2. Furthermore, the last 138 amino acids are replaced by a unique 27 amino acid sequence at the C-terminal domain [5]. Compared to ERa, ERa-36 displays distinct expression patterns. Indeed, while ER α is mainly expressed in the nucleus of ER α -positive tumors, ER α -36 is mainly expressed at the level of the plasma membrane of breast tumor cells [6], co-localized with caveolin, a typical cell-surface protein [7, 8]. ER α -36 was shown to activate ERK1/2 through the protein kinase C delta signaling pathway, leading to an increase in the expression of cyclin D1/CDK4, which increases cell cycle progression [9]. In addition, binding of ERa-36 to ERK prevents its dephosphorylation by MKP3 and enhances a paxillin/cyclin D1 pathway [10]. Moreover, ER α -36 signaling contributes to the potential invasion and metastatic spread of cancer cells [11].

Surprisingly, unlike ER α , ER α -36 is activated by the estrogen antagonist tamoxifen and fulvestrant, both compounds routinely used in ER α -positive BC treatment [8]. Accumulating experimental and clinical evidence supports that BC may arise from mammary stem/progenitor cells which possess self- renewal abilities. Recently, it was reported that ER α -36-mediated estrogen signaling plays an important role in the maintenance of ER α -positive and -negative breast cancer stem/progenitor cells [12]. ER α -36 is also a marker of poor prognosis in BC and its expression is associated with resistance to tamoxifen treatment, probably due to its high expression in stem cells, known to possess an intrinsic resistance to treatment [11, 13].

The aim of this study was to investigate whether the prognostic value of ER α -36 was associated with a particular subtype of BC. We unveiled a correlation between ER α -36 expression and poorer PR-positive patient survival, suggesting a functional relationship between ER α -36 and PR signaling. We clearly showed that ER α -36 regulates PR expression and activity, regulating cell proliferation, thus confirming its importance in BC.

2. Results

2.1 Clinico-pathological characteristics

We evaluated ERα-36 expression in a cohort of patients displaying invasive breast cancer. Table 1 summarizes the clinico-pathological characteristics of the patient cohort tested. For the 160 assessable patients, the median follow-up interval was 10 years (ranging from 0.2-12 years). Median age at diagnosis was 56.9 years (ranging from 30.4-87.4 years). Regarding tumor stage, 57.5% of patients displayed tumors exceeding 20 mm, and 52.5% had axillary lymph node (LN) metastases. 16.3% of the patients had SBR grade I tumors, 44.4% had grade II tumors and 39.4% grade III tumors. Adjuvant chemotherapy was administered to 63.1% of patients, while 83.1% received adjuvant hormonal therapy.

Characteristic		Number	percent	
Age group (years)	<u><</u> 50	51	31.9%	
	> 50	109	68.1%	
Menopausal status	Pre	57	35.6%	
-	Post	103	74.4%	
Tumor size (cm)	<u><</u> 2	68	42.5%	
	>2	92	57.5%	
Axillary LN metastasis	No	76	47.5%	
	Yes	84	52.5%	
SBR grade	Ι	26	16.3%	
C	II	71	44.4%	
	III	63	39.4%	
ERα-66 status	Negative	14	8.8%	
	Positive	145	90.6%	
	Missing	1		
PR status	Negative	40	25.3%	
	Positive	118	74.7%	
	Missing	2		
HER2 status	Negative	129	84.9%	
	Overexpressed	23	15.1%	
	Missing	8		
Breast cancer subtype	Luminal	142	91.6%	
	Basal	10	6.5%	
	HER2 driven	3	1.9%	
	Missing	5		
Adjuvant Hormonal	No	27	16.9%	
treatment	Yes	133	83.1%	
Adjuvant (or neoadj)	No	59	36.9%	
chemotherapy	Yes	101	63.1%	
ERa-36	Low	95	59.4%	
	High	65	40.6%	

Table 1: Clinico-pathological characteristics, treatment received and ER α -36 expression in the patient cohort tested (160 patients)

2.2 Pattern of ERα-36 expression

Regarding the immunohistochemical (IHC) analysis of ER α -36, all of the tumors displayed a faint diffuse cytoplasmic ER α -36 expression (Figure 1A). However, only 65 tumors (40%) had a high membrane expression, while 95 (60%) had a low or were devoid of membrane expression (Figure 1A). The correlation between ER α -36 expression and different clinico-pathological parameters was then statistically investigated (Table 2). No significant correlation was observed between high ER α -36 expression and traditional prognostic markers such as age, menopausal status, tumor size, ER α -66 status, PR status or axillary lymph node metastasis, except for high SBR grade (grade III) (p = 0.04).

Variable		ERa-36 low		ERa	-36 high	P *
		No.	$\binom{0}{0}$	No.	$\binom{0}{0}$	
		95	(59.4%)	05	(40.0%)	
Age (years)	<i>Mean</i> (<u>+</u> <i>SD</i>)	57.9	(±11)	61.3	(±11)	0.20^{+}
Breast side	-Right	42	(44.2%)	30	(46.2%)	0.81
	-Left	53	(55.8%)	35	(53.8%)	
Age group (years)	- < 50	32	(33.7%)	19	(29.2%)	0.55
	- > 50	63	(66.3%)	46	(70.8%)	
Tumor size (cm)	- < 2	41	(43.2%)	27	(41.5%)	0.84
rumor size (em)	->2	54	(56.8%)	38	(58.5%)	0.01
		-	()		()	
LN met	-Negative	45	(47.4%)	31	(47.7%)	0.97
	-Positive	50	(52.6%)	34	(52.3%)	
SBR grade	-Gr 1	13	(13.7%)	13	(20.0%)	0.04
-	-Gr 2	50	(52.6%)	21	(32.3%)	
	-Gr 3	32	(33.7%)	31	(47.7%)	
ERα-66 status	-Negative	9	(9.6%)	5	(7.7%)	0.68
	-Positive	85	(90.4%)	60	(92.3%)	
PR status	-Negative	23	(24.5%)	17	(26.6%)	0.77
	-Positive	71	(75.5%)	47	(73.4%)	
HER2 status	-Negative	78	(85.7%)	51	(83.6%)	0.72
IIIIN2 status	-Positive	13	(14.3%)	10	(16.4%)	0.72
	1 0000000	10	(1.10,0)	10	(1011/0)	
(Neo)/Adjuvant	-Tam.	64	(85.3%)	43	(75.4%)	0.33
Hormonal ttt	-Tam.+AI	4	(5.3%)	4	(7.0%)	
	-AI	7	(9.3%)	10	(17.5%)	
(Neo)/ Adjuvant	-Anthra. only	43	(79.6%)	29	(80.5%)	0.30
chemotherapy	-Anthra	11	(20.4%)	7	(19.5%)	
	&Taxane					

Table 2: Correlation between ERα-36 expression and clinico-pathological features*Correlations tested using Pearson's Chi square test (2 sided) unless otherwise specified† Difference between means using the Student t-test†† Fisher's exact testTam: tamoxifen; AI: aromatase inhibitor; Anthra: antracycline

2.3 High ERa-36 expression predicts poorer outcome in BC

Given the correlation between high ER α -36 expression and high SBR grade, we next assessed its predictive value using Kaplan Meier curves in the context of disease metastasis-free survival (DMFS), disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) for patients with high versus low ER α -36 expression (Figure 1B). At 8 years, rates of DMFS, DFS and OS were all higher in patients with high compared to low ER α -36 expression with 59.0% versus 76.6% (DMFS : HR = 2.02, 95%CI: 1.2-3.4, p = 0.007), 54.7% versus 70.9% (DFS : HR = 1.69, 95%CI: 1.1-2.7, p = 0.029), and 68.6% versus 79.6% (OS : HR = 1.82, 95%CI: 1.02-3.2, p = 0.040), respectively.

Regarding the effect of classical prognostic factors, DMFS was shorter for patients with tumors larger than 2 cm (HR = 2.17, 95%CI: 1.2-3.8, p = 0.007), axillary LN metastases (HR = 2.04, 95%CI: 1.2-3.5, p = 0.009) and high SBR grade (HR = 2.64, 95%CI: 1.6-4.4, p = 0.0002). In the multivariate analysis, when adjusted to tumor size, LN metastasis and SBR grade, high ER α -36 expression was still an independent predictor for DMFS (HR = 1.93, 95%CI: 1.1-3.3, p = 0.016) with a tendency towards poorer OS (HR = 1.65; 95%CI: 0.9-3.0, p = 0.09). In addition to ER α -36, large tumor size (HR = 1.84; 95%CI: 1.04-3.28, p = 0.04) and high SBR grade (HR = 2.04; 95%CI: 1.2-3.5, p = 0.008) were also independent predictors of poor DMFS in the same multivariate model.

Interestingly, the impact of ER α -36 expression on distant metastasis-free relapse was limited to PR-positive patients (Figure 1C).

Indeed, in the PR-positive patient cohort, the 8 year DMFS rate was 57.2% in patients with high ER α -36 expression compared to 84.7% in patients with low ER α -36 expression (p < 0.001). On the contrary, in the PR-negative cohort, the difference in this rate was non-significant with values of 60.7% and 52.2% in high versus low ER α -36 expression (p = 0.59).

Altogether, these results show that $ER\alpha$ -36 expression at the plasma membrane is a poor prognosis marker impacting patient's survival of PR-positive BC.






Figure 1: Expression of ERa-36 in breast tumors

A) ERα-36 expression was analyzed by immunohistochemistry (IHC) on formalin-fixed human tumors. Representative images of different IHC staining profiles are shown (panel a: high expression and panel b: low expression). *B)* Kaplan-Meier estimates of disease-metastases free survival (DMFS) (left), disease-free survival (DFS) (middle) and overall survival (OS) (right) in patients with low (blue) versus high (green) membranous ERα-36 expression. *C)* Kaplan-Meier estimates of DMFS in patients with low (blue) versus high (green) ERα-36 expression in 2 groups of patients according to PR expression.

2.4 ERa-36 is a new partner of PR

Based on the previous results, we hypothesized that ER α -36 could be a bad prognosis marker in PR-positive BC because it interferes with progesterone signaling. To evaluate whether these proteins interacted directly, we initially conducted a GST pull-down experiment. We found that radioactive PR specifically interacts with the full length ER α -36 and its truncated form ER α -36 Δ C (truncated C-terminal part), but not with the GST (Figure 2A). By separating the PR protein into 5 fragments (PR1 to PR5), we further identified PR3 and PR5 fragments, as the sites of ER α -36/PR interaction (Figure 2B). We also validated the interaction by coimmunoprecipitation after transfection of both proteins into Cos7 cells (Figure 2C). In addition, we investigated this interaction and its localization in T47D cells that express both proteins, using proximity ligation assay (PLA) and specific antibodies. The images obtained revealed red dots in the nucleus of T47D cells, illustrating the interaction of ER α -36 with PR independently of progesterone treatment (Figure 2D, E, F). The signals strongly decreased in cells following PR down-regulation.

In conclusion, this nuclear interaction suggests that $ER\alpha$ -36 could regulate PR transcriptional activity.



D





Figure 2: ERa-36 interacts with PR

A) A radioactive GST pull-down assay was performed by incubating in vitro ³⁵S-labeled PR (PR #) with GST, GST- ER α -36 and GST- ER α -36 Δ C. The corresponding Coomassie-stained gel is shown below. Arrows indicates the full length fusion proteins. B) PR was divided into 5 fragments (PR1 to PR5). Radioactive ER α -36 (ER α -36 #) was incubated with the different domains of PR fused to GST and the bound proteins were visualized by autoradiography. The corresponding Coomassie-stained gel is shown below. > indicates the full length fusion proteins. C) pSG5Flag-ERa-36 and pCDNA3V5-PR were overexpressed in Cos7 cells. Cell lysates were immunoprecipitated with the anti-Flag antibody and the presence of ER α -36 and *PR* were visualized by Western blot using the anti-Flag and anti-V5 antibodies, respectively. The lower panel shows the expression of the different proteins in the input. D) Proximity Ligation Assay (PLA) was used to detect the cellular co-localization of endogenous $ER\alpha$ -36 and PR in T47D, grown on coverslips in 12-well plates. Cells were transfected with control siRNA (siCtl) or with siRNA against PR (siPR) and treated for the indicated times with 10 nM of R5020. PLA for ER α -36/PR interaction was performed with anti-PR and anti-ER α -36 specific antibodies. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X60). The detected interactions are represented by red dots. E) Quantification of the number of signals per cell was performed using computer-assisted analysis, as reported in the Materials and Methods section. The mean \pm SD of one experiment representative of three experiments is shown. **F**) The efficacy of PR siRNA treatment analyzed by Western blot analysis is shown in the left-hand panel and quantified in the right-hand panel where PR expression relative to tubulin was quantified using ChemiDoc MP (Biorad).

2.5 ERa-36 regulates PR expression

To further investigate the role of ER α -36 in progesterone signaling, we used the CRISPR/cas9 technology to specifically knock out the exon coding the isoform. Genomic DNA sequencing of ER α -36 KO clones of T47D cells revealed deletion at the targeted site. By RT-PCR, we evaluated mRNA expression of the different clones and chose F4 for wild type (WT) and A6 and G3 for KO clones (Figure 3A). Next, we assessed PR expression by Western blot and observed a significant decrease in KO cells compared to WT cells (Figure 3B). This effect was not due to a decrease in ER α expression, as evidenced by the western blot (Figure 3B). We also studied PR localization, which revealed that although the staining decreased in KO compared to WT clones, it remained within the nucleus (Figure 3C). We then confirmed that this decrease in PR expression occurred in KO cells at the mRNA level by RT-qPCR (Figure 3D). We hypothesized that this decrease could be due to a defect of ER α binding to PR promotor, but the low level of ER α binding on the chromatin did not allow to conclude (Sup. Figure 1).







D

111

Figure 3: ERa-36 regulates PR expression

A) $ER\alpha$ -36 and actin mRNA expression were analyzed by RT-PCR in T47D clones: F4 (WT) and A6 (KO-ER36) and G3 (KO-ER α -36). *B)* PR, ER α and tubulin expression was assessed by Western blot in the three clones. Western-Blot quantification was determined comparing PR to Tubulin using ChemiDoc MP (Biorad) to measure chemiluminescence from the immunoblots. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments. The p-value was determined comparing each ER α -36 KO clones to the WT using the Student's t-test. * indicates a p < 0.05, ** p < 0.01. *C)* PR expression was studied by immunofluorescence in the 3 clones. The nuclei were counterstained with DAPI (blue) (Obj: X40). *D*) Total RNA was prepared and cDNAs analyzed by RT-qPCR with specific primers for PR. The values were normalized against 28S mRNA and represent the mean \pm SEM of three experiments.

The p-value was determined comparing each $ER\alpha$ -36 KO clones to the WT using the Student's *t*-test. ** indicates a p < 0.01, ** p < 0.001.

2.6 ERa-36 regulates PR signaling

Next, we investigated whether ER α -36 regulates progesterone signaling. First, we treated T47D cells with R5020, the progesterone analog for different times and performed Western blot analyses to measure ERK activation and PR phosphorylation on its main sites: S294 and S345. As shown in Figure 4A, although pPR S294 and S345 decreased in KO ER α -36 clones compared to the WT, P-ERK remained stable. Quantification of the pPR/PR ratio showed that ER α -36 KO significantly reduced the phosphorylation of PR. Treating T47D cells with an ERK inhibitor or GSK3 inhibitor proved that ERK activity was not implicated in the phosphorylation of these 2 residues (Sup. Figure 2). The decrease in pPR was confirmed by PLA, showing that both pPR in the nucleus are lower in KO clone compared to the WT T47D cells (Figure 4B and 4C).



В



С



Figure 4: ERa-36 regulates PR signaling

A) WT and KO ERα-36 cells were treated with R5020 for the indicated times, cell extracts were then loaded onto a gel and assessed by Western blot for PR, pPR-S294 and S345, P-ERK, ERK and tubulin expression. Quantification was performed in the right-hand panels. *B)* Phosphorylation of PR on S345 was also studied by PLA using a specific antibody and an antibody recognizing PR in the WT and the KO ERα-36 G3 clones. Quantification of the results is shown in the right-hand panel. *C)* The same experiment was performed as in (B) to measure PR phosphorylation on S294.

We also assessed whether ER α -36 regulates PR transcriptional activity, by performing reporter luciferase assays. We found that ER α -36 stimulates PR activity in a dose dependent manner (Figure 5A). Next, we verified the expression of known PR target genes, which appeared to be down-regulated (Figure 5B), up-regulated (Figure 5C) or unchanged (Figure 5D) in ER α -36 KO clones compared to the WT clone. To evaluate whether these variations in gene expression were related to a change in PR binding, we performed ChIP experiments with PR antibody and found that PR binding to chromatin was not significantly modified in KO ER α -36 versus WT clones for all genes targeted irrespective of their level of expression (Figure 5E, F, G).

In conclusion, ER α -36 regulates PR transcriptional activity independently of PR binding to the chromatin.



Figure 5: ERa-36 regulates PR transcriptional activity

A) HeLa cells were transiently transfected with MMTV-LUC reporter plasmid and expression vectors encoding PR and ERa-36 as indicated, using Lipofectamine 2000. Transfected cells were grown in hormone-free medium for 48 h in the presence or absence of 10 nM R5020, and extracts of the harvested cells were tested for luciferase activity using the Promega luciferase assay kit. The results were normalized as indicated and presented as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The p-value was determined using the Student's t-test. * indicates a p < 0.05, *** p < 0.001. **B-D**) Clones of T47D were treated, or not (Eth), 6 h with 10 nM of R5020. Total RNA was prepared and cDNAs analyzed by RT-qPCR with specific primers for SGK1, STAT5A, FKBP5, PDK4, DUSP1 and RGS2. The values were normalized against 28S mRNA and represent the mean \pm SEM of three experiments. The P-value was determined comparing each ER α -36 KO clones to corresponding condition in the WT using the Student's t-test. ** indicates a p < 0.01 and *** indicates a p < 0.001. E-G) T47D clones, grown in charcoal-stripped serum for 48 h and then treated with 10 nM R5020 for 1 h, were subjected to ChIP assay using anti-PR antibody. The precipitated DNA fragments were used for qPCR analysis using specific primers for the indicated promoters. Results are expressed relative to the signal obtained from input chromatin. The mean \pm SEM of at least three experiments is shown. The p-value was determined comparing each $ER\alpha$ -36 KO clones to corresponding condition in the WT using the Student's t-test were not significant.

2.7 ERα-36 regulates progesterone-mediated cell proliferation

The effects of ER α -36 on cell proliferation were next assessed using the Incucyte technology. Figure 6A shows that ER α -36 KO has no major impact on the proliferation of T47D cells. As it has been shown that progesterone inhibits FBS- and E2-induced cell proliferation [14-16], we wondered whether ER α -36 was involved in this process. Of note, we found that the inhibitory effect of R5020 on serum-induced proliferation was lost in ER α -36 KO compared to WT clones (Figure 6B). Interestingly, ER α -36 was also involved in R5020 regulation of E2-induced proliferation. Indeed, while R5020 inhibited the effects of E2 on cell growth in WT cells, this effect on cell proliferation was abolished in ER α -36 KO cells (Figure 6C). The mechanism seems to be independent of ER α /PR interaction since ER α -36 KO does not impair their interaction (Sup. Figure 3).

Altogether, these results clearly demonstrate that $ER\alpha$ -36 is involved in PR expression, signaling and transcriptional activity, highlighting a new regulator of progesterone signaling.



Figure 6: ERa-36 regulates progesterone-mediated cell proliferation

A) T47D clones were plated onto 96-well plates and proliferation was measured using the Incucyte technology. Image acquisition was conducted every hour using the Incucyte software, which calculates the percentage of cell confluency as a function of time over 7 days. Results are represented as graphs showing the rate of proliferation every 24 h. The mean \pm SD of one experiment representative of three experiments is shown. **B**) The experiment was performed as previously described in A) on the T47D clones treated with progesterone (10 nM). **C**) The same experiment was performed but the cells were steroid-deprived and treated with E_2 (10 nM), R5020 (10 nM) or both. **D**) Model of ERa-36 regulation of PR signaling. Upon progesterone treatment, ERa-36 activates a kinase involved in the phosphorylation of PR at S294 and S345 residues. ERa-36 also participates in coregulators recruitment to regulate PR transcriptional activity in a gene dependent manner, which in turns modulates cell proliferation. CoR: coregulators.

Figure 6D summarizes a model thus established according to our findings representing the mechanisms of action of ER α -36 on progesterone signaling. Consistently, this splice variant of ER α regulates PR phosphorylation by participating in the activation of an as yet unidentified kinase, and is also involved in its transcriptional activity as a coregulatory modulating the expression of genes participating in progesterone-mediated cell proliferation, such as DUSP1.

3. Discussion

ER α -36, the well-characterized splice variant of ER α plays an important role in breast tumorigenesis and its expression has been associated with poor patient survival, owing primarily to its involvement in tamoxifen resistance and metastases development [11].

However, its prognostic value has as yet not been studied in different BC subtypes. In this work, based on a cohort of breast cancer patients, we analyzed the expression of ER α -36 alongside patient outcome and traditional prognostic markers, and reveal that its poor predictive value is significantly associated with PR-positive tumors. Moreover, we identify ER α -36 as an important actor of progesterone signaling, modulating its expression, transcriptional activity and anti-proliferative function in breast cancer cells.

We herein found that ER α -36 is expressed in the cytoplasm of all tumors although its membrane expression occurs in 40% of breast tumors independently of ER α status. These results corroborate previous studies on ER α -36 expression in BC [11, 13]. In addition, its expression was associated with a high SBR grade and a decrease in patient survival in terms of OS, DFS and DFMS, supporting published results showing that ER α -36 is associated with the development of metastases [11]. Of interest, we determined that its prognostic value is significant in PR-positive tumors versus PR-negative tumors, suggesting that ER α -36 could interfere with PR signaling. By several approaches, we clearly demonstrated that ER α -36 binds to PR. Interestingly, its Cterminal domain is not involved in this interaction, indicating that it interacts with PR *via* a domain shared with ER α . We also identified that the interaction between ER α -36/PR occurs *via* its binding to 2 domains of PR, namely PR3 and PR5, containing the DBD and the LBD, respectively. The binding sites are different from those of ER α , as it binds to 2 sites within the PR sequence located within PR1 and PR2 domains [17]. This may explain why ER α -36 KO does not impede ER α to bind PR (Sup. Figure 3).

Interestingly, although ER α -36 is mainly localized in the cytoplasm and at the plasma membrane of cells, it interacts with PR exclusively in the nucleus of the cells, suggesting that ER α -36 could regulate the transcriptional activity of PR. Indeed, ER α -36 has already been shown to regulate the transcription of *ALDH1A1* by binding to its promoter [11].

We also showed that $ER\alpha$ -36 regulates PR expression at the level of the mRNA. The low level of $ER\alpha$ recruitment on PR promotor in T47D cells did not allow to conclude whether this effect is mediated through $ER\alpha$. As miRNAs have been shown to control PR expression [18, 19], we can hypothesize that $ER\alpha$ -36 could regulate miRNAs expression to modulate PR level within the cells.

Interestingly, we found that phosphorylation of PR on S294 and S345 strongly decreased in cells KO for ER α -36, indicating that ER α -36 may regulate the expression and/or activity of kinases. However, although ERK was described to phosphorylate these 2 residues, the kinase is not involved in our present study as p-ERK was not modified in cells KO for ER α -36, although PR phosphorylation strongly decreased, and the ERK inhibitor did not change the phosphorylation status of PR (Sup. Figure 2).

Given the fact that ER α -36 binds PR in the nucleus and that S294 and S345 are involved in the transcriptional activity of PR [20-22], we also assessed whether ER α -36 could regulate PR-mediated transcription. A luciferase assay confirmed that ER α -36 activates the transcriptional activity of PR on an artificial promoter and is involved in the expression of several PR-target genes, including DUSP1, RGS2 and PDK4 (down-regulated), SGK1 (up-regulated), and FKBP5 (unchanged). However, Chip experiments showed that PR binding remains constant for the genes tested. As we found that ER α -36 binds to the E domain of PR, which contains binding sites for coregulators, we can hypothesize that ER α -36 modulates the binding of coregulators in a gene-dependent manner.

Interestingly, although ER α -36 has no striking effect on cell growth, its depletion abolished the inhibitory effect of progesterone on FBS- and E2-dependent cell proliferation. As Carroll's team demonstrated that this effect involves PR/ER α interaction [15], we investigated whether this interaction is modified in cells knock-out for ER α -36, but no difference was observed, suggesting that other mechanisms of regulation may be involved.

121

Recently, Sartorius' team found that the inhibitory effect of progesterone on cell proliferation is largely due to a direct binding of PR to the RNA polymerase III, regulating tRNA transcription affecting gene sets at the translational level [23].

In addition, DUSP1 was reported to mediate inhibitory effects of progesterone on cell proliferation [14, 14], and our present work describes that ER α -36 KO inhibits progesterone-induced DUSP1 transcription, potentially explaining how progesterone fails, at least in part, to inhibit FBS- and E2-dependent cell proliferation in ER α -36 KO cells.

In conclusion, we demonstrate herein that ER α -36 is involved in progesterone anti-proliferative effects, yet its expression is associated with a decrease in patient survival in PR-positive tumors. This discrepancy may be due to the fact that our *in cellulo* results seem to involve nuclear ER α -36, while its poor prognostic value is based on its expression at the plasma membrane. Unfortunately, knock down approaches did not allows us to discriminate between the role of ER α -36 at the plasma membrane and within the nucleus.

Altogether, our present data show that $ER\alpha$ -36 is a new regulator of PR, concomitantly acting on its expression and its activity. Further studies are required to validate its use as a new biomarker for a subset of PR-positive tumors with poor prognosis.

4. Materials and Methods

4.1. Cell culture

T47D were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% penicillin-streptomycin (Life Technologies) and insulin (10 μg/ml). Cos7 cells were maintained in DMEM, supplemented with 10% FBS and 2% penicillin-streptomycin (Life Technologies). All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C, authenticated by Eurofins and tested for Mycoplasma infection (Lonza, Rockland, ME USA). Prior to experiments, when it was indicated, cells were grown in phenol red-free medium supplemented with 10% charcoal-stripped serum (Biowest). Cells were then treated with 10 nM of R5020 (Perkin Elmer) or E2 (Sigma) for the indicated times.

4.2. Generation of CRISPR ERa-36 KO cell lines

Electroporation of T47D cells

Cells were grown at subconfluence and electroporated with CRISPR reagents after cell dissociation using the Neon electroporator Invitrogen 1750V-20ms-1pulse. Electroporated cells were cultured as single cells to obtain pure clonal populations.

Strategy

Guide-RNAs were designed using an in-house genOway's tool, and those with highest score were selected.

Targeted sequences were:

#1: 5' TTAATAAGTACACCGCAG AGG 3'

#2: 5' CTGTGAGGCCTTATGACCAG AGG 3'

These guide-RNAs were designed to induce the deletion of an ER-a36-specific sequence by cutting into intron 8 and downstream of exon 9 (intron 31 and exon 32 with gen0way's numbering).

ER α -36 isoform-specific knock-out clones were amplified and isolated DNA was characterized by PCR-amplification, as the 393bp deleted sequence includes the ER α -36 specific exon 9 splice acceptor site, coding sequence and STOP codon.

4.3. Antibodies

Antibodies	Supplier	Origin	Dilution	Dilution	Dilution
			for WB	for PLA	for IHC
ERa36	Home made	Rabbit	1/1000	1/100	1/50
PR (AB8)	Thermoscientific	Mouse		1/500	
	Santa Cruz		1/2000		
PR (H190)	Biotechnology	Rabbit			
	Cell Signaling		1/1000		
p-PRS294	Technology	Rabbit		1/500	
	Cell Signaling		1/1000		
p-PR S345	Technology	Rabbit		1/500	
Tubulin	Sigma	Mouse	1/10000		
	Call signaling		1/1000		
V5-tag (D3H8Q)	Technology	Rabbit	1/1000		
	reemology		1/1000		
Flag M2	Sigma	Mouse	1/1000		
p44/42	Cell signaling	Dahhit	1/1000		
MAPK(Erk1/2)	Technology	Kabbit			
Phospho p44/42	Cell signaling	Rabbit	1/1000		
MAPK (Erk1/2)	Technology	IXAUUII			

 Table 1. Information of primary antibodies.

4.4 Luciferase reporter assay

HeLa cells (7.5 x 10⁴) were plated in 24-well plates 24 h prior to transfection. The transfected DNA included 100 ng of reporter plasmid and 25 ng of pRL-TK Renilla luciferase vector (Promega) used as an internal control, together with various amounts of expression vectors, as indicated. Total transfected DNA was kept constant by adding empty pSG5-Flag vectors. The cells were induced with 10 nM R5020 24 h following transfection, then harvested after an additional 24 h and assayed for luciferase activity following the manufacturer's instructions. Luciferase activities were normalized against the activity of the internal control Renilla luciferase.

4.5 Immunofluorescence

T47D cells (2 x 10⁵) were grown on coverslips in 12-well plates. After treatment, cells were fixed in methanol for 2 min and washed twice in PBS. Non-specific binding was blocked using a 1% gelatin solution for 30 min at room temperature. Cells were incubated with PR antibody for 1 h at 37°C, subsequently with the secondary antibodies Alexa Fluor 488 anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, UK) (1:2000e) and Alexa Fluor 568 anti-rabbit (Invitrogen, Carlsbard, USA) (1:1000e) in Dako diluent for 1 h. Finally, coverslips were mounted on glass slides in mounting solution (Dako, Carpinteria, CA, USA). The fluorescent slides were viewed under the Nikon NIE microscope.

4.6 Immunoprecipitation and Western blot analysis

Cells were lyzed using RIPA buffer (50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40 and 0.25% deoxycholate) supplemented with protease inhibitor tablets (Roche Molecular Biochemicals) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ and 1 mM β -glycerophosphate).

Protein extracts were incubated with primary antibodies overnight at 4°C on a shaker. Protein G-Agarose beads were added, and the mixture was incubated for 2 h at 4°C. The immunoprecipitated proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and analyzed by Western blot, then visualized by electrochemiluminescence (ECL, Roche Molecular Biochemicals).

4.7 Chromatin immunoprecipitation

ChIP experiments were performed according to the manufacturer's protocol (SingleChIP enzymatic chromatin IP Kit - Cell signaling) with antibodies against PR, ER α and IgG. Results are expressed relative to the signal obtained with chromatin input. Primer sequences are indicated in the Supplemental Material Section.

4.8 RNA extraction and real-time RT-qPCR analysis

Total RNA (one μ g) was extracted and purified using TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, USA), prior to being reverse-transcribed using 100 ng of random primers following the Superscript II (ThermoFisher, USA) protocol. Real time PCR was performed with SYBR Green qPCR master mix (BioRad) in a Step One plus real-time PCR detection system (Applied Biosystems). All amplifications were performed in triplicate. Mean values of triplicate measurements were calculated according to the - $\Delta\Delta$ Ct quantification method, and were normalized against the expression of 28S ribosomal mRNA as reference. Data were presented as mean ± SEM. Sequences of the oligonucleotides used are listed in the Supplementary Material Section.

4.9. Proximity ligation assay, image acquisition and analysis

This technology exposes protein/protein interactions *in situ* [24]. Briefly, cells were seeded and fixed with cold methanol. After saturation, the different couples of primary antibodies were incubated for 1 h at 37°C. The PLA probes consisting of secondary antibodies conjugated with complementary oligonucleotides were incubated for 1 h at 37°C. The amplification step followed the ligation of nucleotides for 100 min at 37°C. Samples were subsequently analyzed under fluorescence microscopy.

The hybridized fluorescent slides were viewed under a Nikon Eclipse Ni microscope. Images were acquired under identical conditions at x60 magnification. Image acquisition was performed by imaging DAPI staining at a fixed Z Position while a Z stack of \pm 5 µm at 1 µm intervals was carried out. The final image was stacked to a single level before further quantification. On each sample, at least one hundred cells were counted. Analysis and quantification of these samples were performed using the Image J software (free access). PLA dots were quantified on 8-bit images using the 'Analyse Particles' command, while cells were counted using the cell counter plugin.

IHC images were also acquired using Nikon Eclipse Ni microscope at x40 magnification and PLA dots were quantified as described above.

4.10 Glutathione transferase (GST) pull-down assay

ER α -expressing plasmids were transcribed and translated *in vitro* using T7-coupled reticulocyte lysate in the presence of [³⁵S] methionine. GST-fusion proteins were incubated with labeled proteins in 200 µl of binding buffer (Tris 20 mM pH 7.4, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, glycerol 10%, Igepal 0.25% with 1 mM DTT and 1% milk) for 2 h at room temperature. After washing, bound proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography.

4.11 Proliferation studies

 4×10^3 cells were seeded onto a 96-well plate were plated 5 h before incubation with the different hormones (E2, R5020 or ethanol). Images were acquired using an IncuCyte ZOOM over 7 days, and cell proliferation was measured as the percentage of cell density observed over this period. Results are represented as graphs indicating the rate of proliferation over time, extrapolated from at least three independent experiments, each performed in triplicate.

4.12 Patient population

We screened 200 consecutive female patients with operable breast cancers who had undergone radical surgery and received adjuvant/neoadjuvant therapy in the Centre Léon Bérard between January 1999 and December 2001. Paraffin blocks of tumor tissue were available for 182 patients. Among these, we failed to assess ER α -36 in 22 tumor specimens as a result of insufficient tumor or tissue loss during TMA preparation. Therefore, a total of 160 specimens were analyzed in this study.

Patients having undergone either modified radical mastectomy (MRM), or breast-conserving surgery (BCS) with axillary lymph node (LN) staging. ER α -66 and PR were detected by immunohistochemistry and tumors were considered positive if they display nuclear staining in 10% or more of the tumor cells. HER2 expression was determined using immunohistochemistry and tumors were considered positive if they reached 3+ staining by immunohistochemistry or 2+ staining with HER2 amplification detected by FISH.

The data exported from patient files for analysis included: age, histological subtype, maximum tumor size, number of LNs involved, SBR grade, ER, PR, HER2 status, date of diagnosis, date of relapse, and date of death or last clinical visit. Tumor samples and clinical data were obtained with the approval of the Institutional Review Board. This study is reported according to the REMARK criteria [25].

4.13 Immunohistochemical analysis

The breast tumor samples were inserted as triplicates using a 600 μ m needle into 4 tissue micro array (TMA) blocks. The blocks containing invasive carcinoma were sectioned at a thickness of 4 μ m. After deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidases were blocked by incubating the slides in 5% hydrogen peroxide in sterile water. For heat induced antigen retrieval, tissue sections were boiled in 10 mM Citrate Buffer pH 6.0 (Dako, Trappes, France) using a water bath at 98°C for 50 min.

The slides were then incubated at room temperature for 1 h with the antibodies against ER α -36 (rabbit polyclonal antibody). These antibodies were diluted using an antibody diluent solution (Chemmate,Dako, Trappes, France) at 1/50. After rinsing in PBS, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody bound to a streptavidin peroxidase conjugate (LSAB+ Kit, Dako, Trappes, France). Bound antibodies were detected by adding the substrate 3,3-diamino-benzidine. Sections were counterstained with hematoxylin.

Blinded to the clinical data, biomarker expression was evaluated by 2 observers who assessed both the percentage and the intensity of the membranous staining for ER α -36 in the infiltrative carcinomatous cells only (faint cytoplasmic staining which was found in almost all malignant cells was not considered).

For scoring purposes, the highest intensity of staining in malignant cells was divided into 3 levels (0: no staining, 1: weak staining, 2: moderate to strong staining) and the percentage of stained cells was also classified into 3 levels (0: no stained cells, 1: staining in less than half of the malignant cells, 2: staining in half or more of the malignant cells). Then both intensity and percentage scores were added to obtain a single score (from 0 to 4) in a manner similar to the Allred score for ER and PR staining [26]. For the purpose of correlation and survival analyses, tumors were considered to have a low expression for ER α -36 if they scored between 0-2 and were considered to have high expression above 2.

4.14 Statistical analysis

The correlation between ER α -36 expression and clinico-pathologic characteristics was determined using Pearson's chi square test (or Fisher's exact test). Distant metastasis-free survival (DMFS) was defined as the time from the date of histological diagnosis of breast cancer to the date of distant metastasis or death. Disease-free survival (DFS) was defined as the time from the date of histological diagnosis of breast cancer to the date of any cancer recurrence (local, distant or contralateral) or death. Overall survival (OS) was defined as the time from the date of histological diagnosis of breast cancer to the date of as the time from the date of histological diagnosis of breast cancer to the date of as the time from the date of histological diagnosis of breast cancer to the date of death. The database was locked at 12 years of follow-up and patients who were event-free at the last follow-up visit (or at 12 years) were censored.

Survival curves, median DMFS, DFS and OS (if reached) in addition to 8-year DMFS, DFS and OS (with 95% CIs) were derived from Kaplan-Meier estimates and the curves were compared using log-rank test. Hazard ratios and 95% CIs were calculated using Cox regression model. Cox multivariate analysis was performed to determine whether a factor is an independent predictor of DMFS, DFS or OS after adjusting for other significant factors at the univariate level. All statistical tests were two-sided, and the p-value was considered statistically significant if inferior to 5%. Statistical analyses were performed using SPSS 20.0 statistics package.

Acknowledgements: We would like to thank B. Manship for proofreading the manuscript and C. Languilaire, F. Nasri, A. Colombe and L. Odeyer for technical support. We also Thank Marie Norbert for advices.

Authors' contributions: Conceptualization: MLR, CP; Methodology: HPK, SO, AS, JJ, IT, EC and AR generated the KO clones. Analysis: MLR, CP, LK, IT, OT; Supervision: MLR, CP; writing, review: MLR, CP, LK, HPK. Funding acquisition: MLR

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: We thank, INCA and DGOS for the financial support of the project, PDC from the

Cancéropole CLARA for JJ's wages and the government of Ivory Coast for HPK's wages.

Reference List

- [1] R.J. Santen, N.F. Boyd, R.T. Chlebowski, S. Cummings, J. Cuzick, M. Dowsett, D. Easton, J.F. Forbes, T. Key, S.E. Hankinson, A. Howell, and J. Ingle, Critical assessment of new risk factors for breast cancer: considerations for development of an improved risk prediction model. Endocr. Relat Cancer 14 (2007) 169-187.
- [2] E.A. Musgrove and R.L. Sutherland, Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. Nat. Rev. Cancer 9 (2009) 631-643.
- [3] A. Ring and M. Dowsett, Mechanisms of tamoxifen resistance. Endocr. Relat Cancer 11 (2004) 643-658.
- [4] X.H. Zhang, M. Giuliano, M.V. Trivedi, R. Schiff, and C.K. Osborne, Metastasis dormancy in estrogen receptor-positive breast cancer. Clin. Cancer Res. 19 (2013) 6389-6397.
- [5] Z. Wang, X. Zhang, P. Shen, B.W. Loggie, Y. Chang, and T.F. Deuel, Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336 (2005) 1023-1027.
- [6] Z. Wang, X. Zhang, P. Shen, B.W. Loggie, Y. Chang, and T.F. Deuel, A variant of estrogen receptor-{alpha}, hER-{alpha}36: transduction of estrogen- and antiestrogendependent membrane-initiated mitogenic signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103 (2006) 9063-9068.
- [7] R.A. Chaudhri, R. Olivares-Navarrete, N. Cuenca, A. Hadadi, B.D. Boyan, and Z. Schwartz, Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor-alpha36 (ERalpha36). J. Biol. Chem. 287 (2012) 7169-7181.
- [8] S.L. Lin, L.Y. Yan, X.T. Zhang, J. Yuan, M. Li, J. Qiao, Z.Y. Wang, and Q.Y. Sun, ERalpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. PLoS. One. 5 (2010) e9013.
- [9] J.S. Tong, Q.H. Zhang, Z.B. Wang, S. Li, C.R. Yang, X.Q. Fu, Y. Hou, Z.Y. Wang, J. Sheng, and Q.Y. Sun, ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, mediates estrogenstimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKCdelta/ERK pathway. PLoS. One. 5 (2010) e15408.
- [10] S. Omarjee, J. Jacquemetton, C. Poulard, N. Rochel, A. Dejaegere, Y. Chebaro, I. Treilleux, E. Marangoni, L. Corbo, and M.L. Romancer, The molecular mechanisms underlying the ERalpha-36-mediated signaling in breast cancer. Oncogene 36 (2017) 2503-2514.
- [11] Q. Wang, J. Jiang, G. Ying, X.Q. Xie, X. Zhang, W. Xu, X. Zhang, E. Song, H. Bu, Y.F. Ping, X.H. Yao, B. Wang, S. Xu, Z.X. Yan, Y. Tai, B. Hu, X. Qi, Y.X. Wang, Z.C. He, Y. Wang, J.M. Wang, Y.H. Cui, F. Chen, K. Meng, Z. Wang, and X.W. Bian, Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ERalpha36(+) breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. Cell Res. 28 (2018) 336-358.

- [12] H. Deng, L. Yin, X.T. Zhang, L.J. Liu, M.L. Wang, and Z.Y. Wang, ER-alpha variant ER-alpha36 mediates antiestrogen resistance in ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 144 Pt B (2014) 417-426.
- [13] L. Shi, B. Dong, Z. Li, Y. Lu, T. Ouyang, J. Li, T. Wang, Z. Fan, T. Fan, B. Lin, Z. Wang, and Y. Xie, Expression of ER-{alpha}36, a novel variant of estrogen receptor {alpha}, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. J. Clin. Oncol. 27 (2009) 3423-3429.
- [14] C.C. Chen, D.B. Hardy, and C.R. Mendelson, Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). J. Biol. Chem. 286 (2011) 43091-43102.
- [15] H. Mohammed, I.A. Russell, R. Stark, O.M. Rueda, T.E. Hickey, G.A. Tarulli, A.A. Serandour, S.N. Birrell, A. Bruna, A. Saadi, S. Menon, J. Hadfield, M. Pugh, G.V. Raj, G.D. Brown, C. D'Santos, J.L. Robinson, G. Silva, R. Launchbury, C.M. Perou, J. Stingl, C. Caldas, W.D. Tilley, and J.S. Carroll, Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. Nature 523 (2015) 313-317.
- [16] Z.Y. Zheng, B.H. Bay, S.E. Aw, and V.C. Lin, A novel antiestrogenic mechanism in progesterone receptor-transfected breast cancer cells. J. Biol. Chem. 280 (2005) 17480-17487.
- [17] C. Ballare, M. Uhrig, T. Bechtold, E. Sancho, D.M. Di, A. Migliaccio, F. Auricchio, and M. Beato, Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. Mol. Cell Biol. 23 (2003) 1994-2008.
- [18] D.R. Cochrane, B.M. Jacobsen, K.D. Connaghan, E.N. Howe, D.L. Bain, and J.K. Richer, Progestin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. Mol. Cell Endocrinol. 355 (2012) 15-24.
- [19] A. Gilam, A. Shai, I. Ashkenazi, L.A. Sarid, A. Drobot, A. Bickel, and N. Shomron, MicroRNA regulation of progesterone receptor in breast cancer. Oncotarget. 8 (2017) 25963-25976.
- [20] G.E. Dressing, T.P. Knutson, M.J. Schiewer, A.R. Daniel, C.R. Hagan, C.H. Diep, K.E. Knudsen, and C.A. Lange, Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycle-dependent transcriptional programs in breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 28 (2014) 442-457.
- [21] E.J. Faivre, A.R. Daniel, C.J. Hillard, and C.A. Lange, Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. Mol. Endocrinol. 22 (2008) 823-837.
- [22] C.R. Hagan, A.R. Daniel, G.E. Dressing, and C.A. Lange, Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. Mol. Cell Endocrinol. 357 (2012) 43-49.

- [23] J. Finlay-Schultz, A.E. Gillen, H.M. Brechbuhl, J.J. Ivie, S.B. Matthews, B.M. Jacobsen, D.L. Bentley, P. Kabos, and C.A. Sartorius, Breast Cancer Suppression by Progesterone Receptors Is Mediated by Their Modulation of Estrogen Receptors and RNA Polymerase III. Cancer Res. 77 (2017) 4934-4946.
- [24] O. Soderberg, M. Gullberg, M. Jarvius, K. Ridderstrale, K.J. Leuchowius, J. Jarvius, K. Wester, P. Hydbring, F. Bahram, L.G. Larsson, and U. Landegren, Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat. Methods 3 (2006) 995-1000.
- [25] L.M. McShane, D.G. Altman, W. Sauerbrei, S.E. Taube, M. Gion, and G.M. Clark, Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (remark). Exp. Oncol. 28 (2006) 99-105.
- [26] D.C. Allred, M.A. Bustamante, C.O. Daniel, H.V. Gaskill, and A.B. Cruz, Jr., Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. Evaluation of 130 cases and review of the literature regarding concordance with biochemical assay and clinical relevance. Arch. Surg. 125 (1990) 107-113.

Supplementary Information

ERa-36 regulates progesterone receptor activity in breast cancer

Henri-Philippe Konan, Loay Kassem, Soleilmane Omarjee, Ausra Surmieliova-Garnès, Julien Jacquemetton, Elodie Cascales, Amélie Rezza, Olivier Trédan, Isabelle Treilleux, Coralie Poulard and Muriel Le Romancer

Supplementary Figures



Supplemental Figure 1: Study of ERa binding to PR regulatory sequences

MCF-7 and T47D cells were grown in charcoal-stripped serum for 48 h and then treated with 10 nM E2 for 2 h, were subjected to ChIP assay using anti-ERα antibody. The precipitated DNA fragments were used for qPCR analysis using specific primers for the indicated promoters. Results are expressed relative to the signal obtained from input chromatin.



Supplemental Figure 2: Effect of GSK3 and ERK inhibitors on PR phosphorylation

T47D cells were treated or not with R5020 in the presence or in absence of CHIR99021 (10μ M), a GSK3 inhibitor or SCH772984 (1μ M), an ERK inhibitor. Cell extracts were then assessed by Western blot analysis for pPR-S294, pPR-S345, pERK, ERK and tubulin expression.



Supplemental Figure 3: Study of PR/ERa interaction

Cell extracts from T47D WTF4 and ER α -36KOA6 and G3 were immunoprecipitated with PR or irrelevant antibodies. Western blotting was then used to evaluate ER α interaction (left-hand panel). ER α , PR and GAPDH expression was studied in the inputs (middle panel). Quantification of IP results was performed (right-hand panel).

Supplementary material

Target genes	Sequence (forward)	Sequence (reverse)
285	5'-CGATCCATCATCCGCAATG-3'	5'-AGCCAAGCTCAGCGCAAC-3'
DUSP1	5'-CCTGCAGTACCCCACTCTACG-3'	5'-CCCAAGGCATCCAGCATGTCC-3'
RGS2	5'-AGCTGTCCTCAAAAGCAAGG-3'	5'-TCTGGGCAATCAGAGTTTTG-3'
PDK4	5'-CATACTCCACTGCACCAACG-3'	5'-AGAAATTGGCAAGCCGTAAC-3'
SGK1	5'-GCAGAAGAAGTGTTCTATGCAGT-3'	5'-CCGCTCCGACATAATATGCTT-3'
STAT5A	5'-AAGCCCCACTGGAATGATGG-3'	5'-GGAGTCAAACTTCCAGGCGA-3'
FKBP5	5'-GGATATACGCCAACATGTTCAA-3'	5'-CCATTGCTTTATTGGCCTCT-3'

 Table S1: List of the primers used for RT-qPCR experiments

Table S2: List of the primers used for ChIP-qPCR

Response Elements	Sequence (forward)	Sequence (reverse)
PgR promoter	5'-AGGGAGGAGAAAGTGGGTGT-3'	5'-GGAGAACTCCCCGAGTTAGG-3'
PgR Enhancer 1	5'-GCCTGACCTGTTGCTTCAAT-3'	5'-GCAGGACGACTTCTCAGACC-3'
PgR Enhancer 2	5'-AACGTGTTTGCATCTTGCTG-3'	5'-GGGCTGGCTTTTTATCATTCA-3'
DUSP1	5'-ATCGCAACACTTGGGAAGAC-3'	5'-AACCGCAGAATGTTCCTGAC-3'
PDK4 (-815)	5'-CACATGGCAGGAACTGTACG-3'	5'-CGTACAGGGCAGAGTGAACA-3'
SGK1	5'-TCAATTGTCGTGCTCAAAGG-3'	5'-AGGCAAGAACAGGGAAGTCA-3'
STAT5A	5'-GGACTACTGTGAATTGGCTCGT-3'	5'-GCTTTCTGTTTCTGTTCCTTGA-3'
FKBP5	5'-AACACCCTGTTCTGAATGTGG-3'	5'-GCATGGTTTAGGGGTTCTTG-3'

Discussion et perspectives

Discussion

L'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression des cancers du sein a significativement progressé au cours des dernières années, notamment grâce aux nombreuses études menées sur les voies de signalisation d'ERa. Cependant, l'activation de voies de signalisations œstrogèno-dépendantes dans des lignées ERα-négatives, a fortement suggéré l'implication d'isoformes, qui agiraient de manière indépendante pour activer ces voies de signalisations. La caractérisation d'ERa36 a notamment évolué depuis son identification, démontrant ainsi son fort potentiel prolifératif et métastatique dans les tumeurs mammaires. En effet, depuis son identification, plusieurs études ont montré que ERα36 était associé à un mauvais pronostic dans le cancer du sein. Au cours de ces dernières années, notre équipe a étudié sa valeur pronostique dans une cohorte de 160 tumeurs mammaires, obtenues du Centre Léon Bérard de Lyon. L'anticorps qui cible ERa36 n'étant pas disponible dans le commerce, nous avons fait produire un anticorps polyclonal spécifique d'ERα36, en collaboration avec Covalab Lyon. Dans notre cohorte d'étude, l'expression d'ERα36 était retrouvée dans le cytoplasme de toutes les tumeurs, mais 40% de ces tumeurs exprimaient également ERα36 à la membrane plasmique. Pour la première fois, la valeur pronostique d'ERα36 a été évaluée dans des sous-catégories tumorales, notamment dans des tumeurs PR-positives et PR-négatives. De manière intéressante, cette analyse a révélé que la valeur pronostique d'ERa36 était limitée aux tumeurs PR-positives, laissant suggérer que ERa36 pourrait interférer avec les voies de signalisations de PR. Dans ce contexte, la discussion générale s'articule autour de deux principales questions :

1) Existe-t-il un lien fonctionnel entre ERa36 et PR?

2) ERa36 joue-t-il un rôle dans la signalisation de la progestérone ?

1) Existe-il un lien fonctionnel entre ERa36 et PR

De manière générale, les interactions protéines/protéines sont des mécanismes capables de réguler des fonctions biologiques telles que la senescence, la prolifération *via* l'activation du cycle cellulaire, ou encore l'apoptose.

Plusieurs études ont déjà montré que PR est capable d'interagir avec d'autres récepteurs nucléaires tels que AR, GR (Chen et al., 1997; Yen et al., 1997), et ERα afin de réguler la transcription de gènes cibles.

En effet, ER α et PR sont capables d'interagir au niveau de la membrane plasmique pour activer des cascades de phosphorylation via Src, mais interagissent aussi au niveau de la chromatine pour réguler l'expression de gènes cibles (Ballare et al., 2003; Migliaccio et al., 1998; Mohammed et al., 2015). Etant donné que les isoformes ER α et ER α 36 partagent des domaines d'homologie, il apparaît fondamental de déterminer si ERa36 et PR interagissent ensemble. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé une première approche in *vitro* avec la technique de GST-pull down. Les formes ER α 36 *full-length* et ER α 36 Δ C (délétion des 27 acides aminés C-terminaux), fusionnées à la GST ont été précipitées avec la protéine PR radioactive, traduite in vitro. Notre équipe a auparavant montré que la séquence Cterminale (27 acides aminés) d'ERα36 était impliquée plusieurs rôles. En effet, cette séquence contient un signal d'export nucléaire ainsi qu'un D domain qui possède de fortes capacités d'interaction avec P-ERK2 (Omarjee et al., 2017). Basé sur l'importance de cette séquence Cterminale, nous avons voulu étudier si l'interaction ERα36/PR pourrait se faire *via* ce domaine. L'expérience de GST-pull down a montré que les 2 formes (full-length et ΔC) interagissaient avec PR, ce qui permet de conclure que l'interaction ER α 36/PR se fait via un domaine commun à ERα36 et ERα. Afin de déterminer la (les) région(s) de PR qui interagissent avec ERα36, PR a été « fragmenté » en 5 domaines qui contiennent chacun une région fonctionnelle, soit impliquée dans l'activation de la transcription, soit responsable de la liaison au ligand ou à la liaison à l'ADN. Chaque région fonctionnelle a été précipitée avec la forme full-length d'ERα36, traduite in vitro. De manière intéressante, nous avons trouvé que ERa36 interagissait avec la région DBD et avec la région contenant le LBD et le domaine AF-2 de transactivation de la transcription. Ces résultats suggèrent que ERa36 pourraient réguler à différents niveaux l'activité de PR, d'une part en perturbant sa liaison à l'ADN (interaction avec le DBD), d'autre part en perturbant la fixation de la progestérone (interaction avec la région LBD). En vue d'identifier la localisation cellulaire de l'interaction ER α 36/PR, nous avons utilisé la technique de Proximity Ligation Assay dans la lignée T47D, une lignée cellulaire très utilisée pour étudier la signalisation de la progestérone. Ainsi, nous avons montré que ER α 36 interagit avec PR et ce, indépendamment de la progestérone.
De manière intéressante, cette interaction est majoritairement nucléaire, même en absence de la progestérone, et laisse suggérer l'existence de mécanismes de cross-régulations entre ER α 36 et PR. Ce résultat était inattendu, étant donné que plusieurs études ont montré que ER α 36 avait une localisation principalement cytoplasmique et membranaire (Lin et al., 2010; Omarjee et al., 2017; Vranic et al., 2011). Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer la localisation nucléaire de cette interaction. A partir d'une étude menée par Wang et ses collaborateurs, il a été montré qu'une proportion d'ER α 36, à hauteur de 10% était localisée dans le noyau (Wang et al., 2006). Cependant, très peu de données dans la littérature ont caractérisé le rôle de cette fraction nucléaire. Très récemment, l'équipe de Wang a montré pour la première fois l'activité nucléaire d'ER α 36 qui active la transcription de gènes cibles tels que *ALDH1*, un marqueur des cellules souches tumorales mammaires (Wang et al., 2018). Basé sur ces travaux, nous pouvons suggérer que PR interagit avec la fraction nucléaire d'ER α 36. Une autre hypothèse de l'interaction nucléaire ER α 36/PR, serait que la conformation spatiale de cette interaction masquerait le signal d'export nucléaire d'ER α 36 qui serait donc relocalisé vers le noyau.

2) ERα36 joue-t-il un rôle dans la signalisation de la progestérone ?

a) Rôle dans la régulation de l'expression de PR

L'interaction nucléaire entre ERα36 et PR, ainsi que la localisation structurelle de cette interaction ont laissé suggérer que ERα36 joueraient un rôle dans la signalisation de la progestérone. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons utilisé la technologie de CRISPR/CAS9 dans la lignée T47D afin de supprimer l'expression d'ERα36 (ERα36-KO). De manière inattendue, nous avons observé que l'extinction d'ERα36 était associée à une baisse significative de l'expression de PR, et ce, au niveau transcriptionnel. Etant donné que PR est un gène cible d'ERα, il a été évoqué que cette baisse serait due à ERα. Cependant, l'expression d'ERα étant stable dans les lignées WT et KO, il a été suggéré que ERα36 contrôlerait l'expression de PR en agissant comme un cofacteur d'ERα sur les *enhancers* de PR. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de chIP-qPCR avec ERα, dans les lignées T47D-WT et T47D-ERα36-KO.

L'immunoprécipitation d'ER α sur les enhancers de PR a été testée et observée dans un premier temps dans la lignée MCF-7, qui exprime fortement ER α . Néanmoins, dans la lignée T47D, les faibles quantité d'ER α n'ont pas permis son immunoprécipitation et n'ont donc pas permis d'étudier le potentiel rôle d'ER α 36 en tant que cofacteur d'ER α sur les éléments de réponse de PR.

b) Impact sur l'activité transcriptionnelle de PR

La première approche mise en œuvre pour étudier l'impact d'ERa36 sur l'activité transcriptionnelle de PR consiste en des essais luciférases dans la lignée HeLa. Nous avons montré que ERa36 augmente l'activité de PR sur son promoteur, et ce, de manière dosedépendante. Cette première approche laisse penser que ER α 36 agit comme un coactivateur transcriptionnel de PR. Nous avons étudié cette hypothèse dans les lignées T47D-WT et T47D-ERa36-KO. Plusieurs études ont montré que la phosphorylation de PR sur les sérines 294 et 345, en présence de progestérone, était associée à son activité transcriptionnelle (Dressing et al., 2014; Faivre et al., 2008; Knutson et al., 2017). Ainsi, nous avons cherché à savoir si ERα36 pouvait réguler la phosphorylation de ces deux résidus sérine. Dans les lignées T47D-ERα36-KO, la phosphorylation des sérines 294 et 345 était fortement diminuée, par rapport au niveau observé dans la lignée WT. Par ailleurs, le ratio d'expression de ces deux formes phosphorylées par rapport à PR qui est aussi diminué, montre que ERa36 régule à la fois PR mais aussi sa phosphorylation sur les sérines 294 et 345. Ces deux sérines ont été auparavant décrites pour être phosphorylées par la MAPK/ERK (Faivre et al., 2008; Knutson et al., 2017; Ward and Weigel, 2009). Cependant, l'inhibition d'ERK par un inhibiteur spécifique n'a pas montré d'effet sur les niveaux de phosphorylation des sérines 294 et 345 dans la lignée T47D. Ce résultat suggère donc que la phosphorylation progestérone-dépendante de PR sur ces résidus impliquerait d'autres kinases qui seraient elles-mêmes régulées par ERα36.

Nous avons par la suite étudié l'activation progestérone-dépendante de gènes cibles de PR dans les lignées T47D-WT et T47D-ERα36-KO. Grâce à technique de PCR quantitative, il a été observé qu'un sous-ensemble de gènes cibles : DUSP1, PDK4 et RGS2 étaient diminués dans les lignées KO par rapport à la lignée WT.

143

De manière intéressante, l'expression d'autres gènes était, soit augmentée dans les lignées WT et KO (SGK1) soit inchangées (STAT5A, FKBP5), bien que l'expression de PR soit diminuée dans les lignées KO. Ces résultats montrent que ER α 36 régule différemment les gènes cibles de PR. Afin de déterminer le rôle joué par ER α 36 sur le recrutement de PR au niveau de la chromatine, nous avons immunoprécipité PR avec les promoteurs de chacun des gènes cibles testés, excepté RGS2 dont PR interagit faiblement avec le promoteur. De manière intéressante, le recrutement de PR sur les gènes cibles n'était pas affecté par ER α 36. Ces résultats montrent pour la première fois que ER α 36 agit comme un corégulateur de PR en régulant de manière différentielle son activité transcriptionnelle.

c) Impact de la suppression d'ERa36 sur la prolifération des T47D

La progestérone a été décrite dans plusieurs études comme ayant des propriétés antiprolifératives (Finlay-Schultz et al., 2017; Mohammed et al., 2015). Ainsi, nous avons évalué les effets de cette hormone dans les lignées T47D-ERα36-KO, par rapport à la lignée WT.

Dans la lignée WT, la prolifération était diminuée en présence de progestérone, confirmant les données de la littérature. Cependant, les lignées T47D-ERα36-KO perdaient l'effet antiprolifératif de la progestérone suggérant un rôle potentiel d'ERα36 dans ce mécanisme. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer l'effet d'ERα36 sur la prolifération :

La modification de l'expression de DUSP1 : DUSP1 est une phosphatase activée par la progestérone *via* PR, dans la lignée T47D. Son rôle est d'inhiber la prolifération cellulaire en présence de progestérone. En effet, DUSP1 activée va catalyser la déphosphorylation de MAPK/ERK, ce qui entraîne en aval, l'inhibition des cascades de phosphorylation de la voie MAPK et l'arrêt de la prolifération (Chen et al., 2011). Dans les lignées T47D-ERα36-KO, l'expression de DUSP1 est régulée négativement, ce qui réduirait son activité phosphatase sur P-ERK et augmenterait ainsi la prolifération. ERα36 apparaitrait donc comme un régulateur de la prolifération *via* la régulation de DUSP1.

La modification de la cross-régulation ERα/PR : l'un des mécanismes attribués à l'effet antiprolifératif de la progestérone se situe autour de la cross-régulation entre ERα et PR. Mohammed et collaborateurs ont montré en 2015 qu'en présence de progestérone, PR redirige ERα et ses cofacteurs, du promoteur de gènes de mauvais pronostics (c-Myc, Cycline D1) vers les éléments de réponse de gènes de bon pronostics, associés à une baisse de prolifération (Baird and Carroll, 2016; Mohammed et al., 2015). Une autre étude a montré plus tard, que PR inhibe indirectement l'action proliférative d'ERα en interagissant avec l'ARN polymérase III (Finlay-Schultz et al., 2017). Cette interaction bloque ainsi la synthèse et la disponibilité des ARNt qui produisent les oncoprotéines.

Dans les lignées ERα36-KO, l'expression de PR est significativement réduite. La faible expression de PR laisse suggérer d'une baisse du recrutement du complexe ERα+cofacteurs au niveau du promoteur de gènes de bons pronostics ou encore d'une baisse de l'interaction PR-ARN polymérase III décrite précédemment. L'inhibition de ces deux mécanismes *via* la faible expression de PR pourrait expliquer la perte de l'effet antiprolifératif de la progestérone dans les lignées ERα36-KO.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons montré pour la première fois un lien fonctionnel entre ERα36 et PR, par l'intermédiaire d'une interaction directe entre ces deux récepteurs, d'une part et *via* l'action d'ERα36 sur l'activité transcriptionnelle de PR, d'autre part. Cependant, le rôle joué par ERα36 est distinct entre les cohortes de tumeurs mammaires et la lignée T47D. En effet, l'expression membranaire d'ERα36 est de mauvais pronostic dans les sous-catégories PR-positives alors que ERα36 joue un rôle antiprolifératif dans la lignée T47D (PR-positive). Il apparaît donc nécessaire d'étudier l'effet d'ERα36 dans d'autres lignées cancéreuses mammaires ainsi que dans une cohorte de tumeurs plus large afin de mieux préciser son rôle dans les sous-catégories.

Plusieurs perspectives pourraient être suggérées afin de progresser dans la caractérisation de cette relation fonctionnelle. ERα36 et PR étant des biomarqueurs fondamentaux du cancer du sein, une meilleure compréhension de leur cross-régulation aurait à long terme, un intérêt majeur dans de développement de thérapies ciblées.

1) Rôle d'ERa36 dans la régulation de l'expression de PR

L'extinction d'ERa36 par CRISPR/CAS9 dans la lignée T47D était associée à une baisse de l'expression de PR, au niveau transcriptionnel. Il apparaît important d'identifier les mécanismes par lesquels ERa36 régule l'expression de PR. La première hypothèse qui a été émise est que ERa36 agirait comme un cofacteur d'ERa afin de réguler la transcription de PR. Néanmoins, la faible expression basale d'ERa dans la lignée T47D ne permet pas de l'immunoprécipiter par chIP avec les *enhancers* qui régulent PR. Un moyen de contourner cette limite serait d'utiliser la lignée MCF-7 qui exprime constitutivement ERa et de réaliser l'extinction ou la surexpression stable d'ERa36. La seconde hypothèse serait que ERa36 contrôlerait l'expression de miRNAs qui ciblent PR. Comme indiqué dans le chapitre 4, PR contient de nombreux sites de fixation de miRNAs dans sa séquence 3'-UTR. Un *screening* de l'expression de ces miRNAs dans les lignées T47D ERa36-KO permettrait de vérifier cette hypothèse.

2) Rôles différentiels d'ERa36 sur l'activité transcriptionnelle de PR et la prolifération

Nous avons montré que ERα36 régulait de manière différentielle l'activité transcriptionnelle de PR. En effet, malgré la baisse significative de l'expression de PR dans les lignées T47D-ERα36-KO, le recrutement de PR sur le promoteur de ses gènes cibles restait inchangé ainsi que la transcription de certains gènes cibles. Il apparaît nécessaire d'identifier comment ERα36 co-régule l'activité transcriptionnelle de PR, en déterminant si ERα36 interagit avec les co-régulateurs de PR déjà décrits. Par ailleurs, la caractérisation du rôle joué par ERα36 dans la phosphorylation de PR (sérines 294 et 345) semble fondamentale. Plusieurs kinases sont capables de phosphoryler ces deux résidus sérines ; et l'identification de la kinase régulée par ERα36 permettrait d'éclaircir ce mécanisme.

En outre, la caractérisation des mécanismes par lesquels ER α 36 régule la prolifération cellulaire en présence de progestérone paraît importante. La réexpression de DUSP1 dans les lignées T47D- ER α 36-KO permettrait de savoir si la régulation de la prolifération par ER α 36 passe par DUSP1. De plus, nous envisageons de déterminer si ER α 36 est impliqué dans le recrutement de PR et ER α sur des gènes de bon pronostic.

Annexes

Annexes : Troubleshooting

L'étude des relations fonctionnelles entre ERa36 et PR a débuté par une série d'expériences que nous avons réalisées afin d'inhiber l'expression d'ERa36 avec des siRNA ou shRNA, ceci dans le but de voir son effet sur PR. Cependant, nous avons rencontré un nombre important de difficultés techniques dans l'établissement de lignées stables. Cette partie résume une série d'expériences que j'ai réalisées au cours de ma thèse mais qui n'ont pas permis d'invalider ERa36.

I- Extinction de l'expression d'ERα36

Afin d'inhiber l'expression d'ERα36 dans les T47D, nous avons utilisé des siRNAs et de shRNAs. Le plus grand défi dans le design de ces petits ARNs était d'utiliser ceux qui ne ciblent pas en même temps la forme canonique ERα. En effet, ces 2 protéines possèdent des séquences communes dans leur ARNm.

1) Extinction avec des siRNAs

Nous avons synthétisé un total de quatre petits ARNs (Tableau TS1) que nous avons utilisés dans la lignée T47D. Après analyse de l'extinction par les différents siRNAs, les expériences ont été poursuivies avec le si w2 qui présentait un meilleur profil d'extinction à 25nM (Figure TS1-A). Ainsi, après traitement et validation de l'extinction d'ERα36, nous avons analysé l'expression de PR (*PgR*) ainsi que deux de ses gènes cibles : PDK4 et STAT5A, 8h post-traitement à la progestérone. Comme observé dans les clones ERα36-KO (voir partie résultats), l'inhibition d'ERα36 entraîne celle de PR (Figure TS1-B). Cependant, ce résultat n'était pas reproductible faute de stabilité des siRNAs.

Nomenclature	Séquence
siRNA 1 (si 1)	GGUCAAAGAUCAAGAUCAAdTdT
siRNA 2 (si 2)	GAAUGUGCCUGGCUAGAGAdTdT
siRNA W1 (si W1)	GCAATTATTCCTTTGCCTTGCdTdT
siRNA W2 (si W2)	GCGTTGCATCATAACATAAGCdTdT

Tableau TS1 : Séquences des siRNAs ciblant ERα36. Le siRNA 2 (si 2) cible une séquence commune à ERα36 et ERα.



Figure TS1 : Profil d'extinction d'ERα36 dans les T47D. A : 4 siRNAs ont été testés, soit individuellement, soit en combinaison (si w1+ si w2). B : Analyse par RT-qPCR, de l'expression de PR (PgR) et de deux de ses gènes cibles, 8h post-traitement à la progestérone.

2) Extinction avec des shRNAs

Afin d'éteindre stablement l'expression d'ERα36, nous avons fait synthétiser trois différents shRNAs que nous avons utilisés dans la lignée T47D. Ces shRNAs ciblent spécifiquement ERα36 (Tableau TS2). La transduction des particules virales contenant ces shRNAs est suivie d'un traitement à la puromycine pour sélectionner les cellules transfectées. Une fois l'étape de sélection réalisée, nous avons vérifié l'extinction d'ERα36 qui était effective (Figure TS2-A). Cependant, au cours des passages successifs, l'extinction d'ERα36 était progressivement perdue (Figure TS2-B). Par ailleurs, nous avons produit des sous-clones à partir de la lignée T47D-sh1, puis sélectionné les clones résistants à la puromycine (TS2-C). Le clone C2 qui présentait le meilleur profil, a lui aussi perdu au cours des passages, l'inhibition d'ERα36.

Ainsi, à la suite de ces problèmes, nous avons opté pour la technologie CRISPR/CAS9 pour invalider ERα36.

Nomenclature	Séquence
shRNA 1 (sh1)	TGTAGAAGCAAAGAAGAGAAT
shRNA 2 (sh2)	TTCCCTCACTCCTTCAAATTT
shRNA 3 (sh3)	TCCGGACTACAGTGCAATTAT

Tableau TS2 : Séquences des shRNAs ciblant ERα36



Figure TS2 : Extinction d'ERα36 par des shRNAs. A : Profil d'expression d'ERα36 avec le sh1. B : expression d'ERα36 avec les sh1, sh2 et sh3, après 3 passages successifs, à partir de l'établissement du phénotype d'extinction d'ERα36. C : Expression d'ERα36 dans différents sous-clones obtenus à partir du clone sh1. NT : non transfecté.

Références bibliographiques

Abdel-Hafiz, H.A., and Horwitz, K.B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology *140*, 80–89.

Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (2002). The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. J. Biol. Chem. *277*, 33950–33956.

Abdel-Hafiz, H., Dudevoir, M.L., and Horwitz, K.B. (2009). Mechanisms underlying the control of progesterone receptor transcriptional activity by SUMOylation. J. Biol. Chem. *284*, 9099–9108.

Acconcia, F., Ascenzi, P., Fabozzi, G., Visca, P., and Marino, M. (2004). S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. *316*, 878–883.

Africander, D., Verhoog, N., and Hapgood, J.P. (2011). Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. Steroids *76*, 636–652.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *100*, 3983–3988.

Anbalagan, M., and Rowan, B.G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. Mol. Cell. Endocrinol. *418 Pt 3*, 264–272.

Anderson, W.F., Chatterjee, N., Ershler, W.B., and Brawley, O.W. (2002). Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. Breast Cancer Res. Treat. *76*, 27–36.

Andrieu, G., Ledoux, A., Branka, S., Bocquet, M., Gilhodes, J., Walzer, T., Kasahara, K., Inagaki, M., Sabbadini, R.A., Cuvillier, O., et al. (2017). Sphingosine 1-phosphate signaling through its receptor S1P5 promotes chromosome segregation and mitotic progression. Sci Signal *10*.

Asselin-Labat, M.-L., Sutherland, K.D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N.C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F.G., van der Wees, J., et al. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. Nat. Cell Biol. *9*, 201–209.

В

Baird, R.D., and Carroll, J.S. (2016). Understanding Oestrogen Receptor Function in Breast Cancer and its Interaction with the Progesterone Receptor. New Preclinical Findings and their Clinical Implications. Clinical Oncology *28*, 1–3.

Ballaré, C., Castellano, G., Gaveglia, L., Althammer, S., González-Vallinas, J., Eyras, E., Le Dily, F., Zaurin, R., Soronellas, D., Vicent, G.P., et al. (2013). Nucleosome-driven transcription factor binding and gene regulation. Mol. Cell *49*, 67–79.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 136, 215–233.

Bartlett, J., Mallon, E., and Cooke, T. (2003). The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? J. Pathol. *199*, 411–417.

Beato, M., and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. Hum. Reprod. Update *6*, 225–236.

Beato, M., and Vicent, G.P. (2012). Impact of chromatin structure and dynamics on PR signaling. The initial steps in hormonal gene regulation. Mol. Cell. Endocrinol. *357*, 37–42.

Bernstein, J.L., WECARE Study Collaborative Group, and Concannon, P. (2017). *ATM*, radiation, and the risk of second primary breast cancer. International Journal of Radiation Biology *93*, 1121–1127.

Berry, N.B., Fan, M., and Nephew, K.P. (2008). Estrogen receptor-alpha hinge-region lysines 302 and 303 regulate receptor degradation by the proteasome. Mol. Endocrinol. *22*, 1535–1551.

Björnström, L., and Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol. Endocrinol. *19*, 833–842.

de Boer, M.C., Wörner, E.A., Verlaan, D., and van Leeuwen, P.A.M. (2017). The Mechanisms and Effects of Physical Activity on Breast Cancer. Clin. Breast Cancer *17*, 272–278.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature Medicine *3*, 730–737.

Bourdeau, V., Deschênes, J., Métivier, R., Nagai, Y., Nguyen, D., Bretschneider, N., Gannon, F., White, J.H., and Mader, S. (2004). Genome-wide identification of high-affinity estrogen response elements in human and mouse. Mol. Endocrinol. *18*, 1411–1427.

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

С

Cabodi, S., Moro, L., Baj, G., Smeriglio, M., Di Stefano, P., Gippone, S., Surico, N., Silengo, L., Turco, E., Tarone, G., et al. (2004). p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. J. Cell. Sci. *117*, 1603–1611.

Calvo, V., and Beato, M. (2011). BRCA1 counteracts progesterone action by ubiquitination leading to progesterone receptor degradation and epigenetic silencing of target promoters. Cancer Res. *71*, 3422–3431.

Carpenter, K.D., and Korach, K.S. (2006). Potential Biological Functions Emerging from the Different Estrogen Receptors. Annals of the New York Academy of Sciences *1092*, 361–373.

Carrasco, E., Alvarez, P.J., Prados, J., Melguizo, C., Rama, A.R., Aránega, A., and Rodríguez-Serrano, F. (2014). Cancer stem cells and their implication in breast cancer. Eur. J. Clin. Invest. 44, 678–687.

Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E.V., Geistlinger, T.R., et al. (2005). Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. Cell *122*, 33–43.

Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *89*, 4285–4289.

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

Catsburg, C., Miller, A.B., and Rohan, T.E. (2015). Active cigarette smoking and risk of breast cancer. Int. J. Cancer *136*, 2204–2209.

Chantalat, E., Boudou, F., Laurell, H., Palierne, G., Houtman, R., Melchers, D., Rochaix, P., Filleron, T., Stella, A., Burlet-Schiltz, O., et al. (2016). The AF-1-deficient estrogen receptor ER α 46 isoform is frequently expressed in human breast tumors. Breast Cancer Res. *18*, 123.

Charafe-Jauffret, E., Chaffanet, M., Bertucci, F., Ginestier, C., Jacquemier, J., deLapeyrière, O., and Birnbaum, D. (2007). Les cancers du sein: Vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré. Med Sci (Paris) *23*, 626–632.

Chauchereau, A., Amazit, L., Quesne, M., Guiochon-Mantel, A., and Milgrom, E. (2003). Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. J. Biol. Chem. *278*, 12335–12343.

Chaudhri, R.A., Olivares-Navarrete, R., Cuenca, N., Hadadi, A., Boyan, B.D., and Schwartz, Z. (2012). Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor- α 36 (ER α 36). J. Biol. Chem. 287, 7169–7181.

Chen, S. y, Wang, J., Yu, G. q, Liu, W., and Pearce, D. (1997). Androgen and glucocorticoid receptor heterodimer formation. A possible mechanism for mutual inhibition of transcriptional activity. J. Biol. Chem. *272*, 14087–14092.

Chia, S., Norris, B., Speers, C., Cheang, M., Gilks, B., Gown, A.M., Huntsman, D., Olivotto, I.A., Nielsen, T.O., and Gelmon, K. (2008). Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. J. Clin. Oncol. *26*, 5697–5704.

Choi, M., Kipps, T., and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. Molecular Cancer Therapeutics *15*, 1781–1791.

Chung, H.H., Sze, S.K., Tay, A.S.L., and Lin, V.C.-L. (2014a). Acetylation at lysine 183 of progesterone receptor by p300 accelerates DNA binding kinetics and transactivation of direct target genes. J. Biol. Chem. *289*, 2180–2194.

Chung, H.H., Sze, S.K., Woo, A.R.E., Sun, Y., Sim, K.H., Dong, X.M., and Lin, V.C.-L. (2014b). Lysine Methylation of Progesterone Receptor at Activation Function 1 Regulates both Ligand-independent Activity and Ligand Sensitivity of the Receptor. J. Biol. Chem. *289*, 5704–5722.

Cirillo, L.A., McPherson, C.E., Bossard, P., Stevens, K., Cherian, S., Shim, E.Y., Clark, K.L., Burley, S.K., and Zaret, K.S. (1998). Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. EMBO J. *17*, 244–254.

Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M., and Zaret, K.S. (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. Mol. Cell *9*, 279–289.

Clarke, C.L., and Graham, J.D. (2012). Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. PLoS ONE *7*, e35859.

Cochrane, D.R., Jacobsen, B.M., Connaghan, K.D., Howe, E.N., Bain, D.L., and Richer, J.K. (2012). Progestin regulated miRNAs that mediate progesterone receptor action in breast cancer. Mol. Cell. Endocrinol. *355*, 15–24.

Colditz, G.A. (1998). Relationship Between Estrogen Levels, Use of Hormone Replacement Therapy, and Breast Cancer. J Natl Cancer Inst *90*, 814–823.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. Cancer Res *65*, 10946–10951.

Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A.Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A.A., and Gerlich, D.W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. Nature *535*, 308–312.

D

Dai, X., Chen, A., and Bai, Z. (2014). Integrative investigation on breast cancer in ER, PR and HER2-defined subgroups using mRNA and miRNA expression profiling. Sci Rep *4*, 6566.

Dai, X., Xiang, L., Li, T., and Bai, Z. (2016). Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. J Cancer 7, 1281–1294.

Daniel, A.R., Gaviglio, A.L., Czaplicki, L.M., Hillard, C.J., Housa, D., and Lange, C.A. (2010). The progesterone receptor hinge region regulates the kinetics of transcriptional responses through acetylation, phosphorylation, and nuclear retention. Mol. Endocrinol. *24*, 2126–2138.

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

Delpech, Y., Wu, Y., Hess, K.R., Hsu, L., Ayers, M., Natowicz, R., Coutant, C., Rouzier, R., Barranger, E., Hortobagyi, G.N., et al. (2012). Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *135*, 619–627.

Delrieu, L., Pérol, O., Fervers, B., Friedenreich, C., Vallance, J., Febvey-Combes, O., Pérol, D., Canada, B., Roitmann, E., Dufresne, A., et al. (2018). A Personalized Physical Activity Program With Activity Trackers and a Mobile Phone App for Patients With Metastatic Breast Cancer: Protocol for a Single-Arm Feasibility Trial. JMIR Res Protoc *7*, e10487.

Deng, H., Zhang, X.-T., Wang, M.-L., Zheng, H.-Y., Liu, L.-J., and Wang, Z.-Y. (2014). ER-α36mediated rapid estrogen signaling positively regulates ER-positive breast cancer stem/progenitor cells. PLoS ONE *9*, e88034.

Denger, S. (2001). ER Gene Expression in Human Primary Osteoblasts: Evidence for the Expression of Two Receptor Proteins. Molecular Endocrinology *15*, 2064–2077.

DeSantis, C., Howlader, N., Cronin, K.A., and Jemal, A. (2011). Breast cancer incidence rates in U.S. women are no longer declining. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. *20*, 733–739.

DeSantis, C., Ma, J., Bryan, L., and Jemal, A. (2014). Breast cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin *64*, 52–62.

Díaz, A., López-Grueso, R., Gambini, J., Monleón, D., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K.M., Viña, J., and Borrás, C. (2019). Sex Differences in Age-Associated Type 2 Diabetes in Rats—Role of Estrogens and Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev *2019*.

Diep, C.H., Daniel, A.R., Mauro, L.J., Knutson, T.P., and Lange, C.A. (2015). Progesterone action in breast, uterine, and ovarian cancers. J Mol Endocrinol *54*, R31–R53.

Dong, X., Challis, J.R.G., and Lye, S.J. (2004). Intramolecular interactions between the AF3 domain and the C-terminus of the human progesterone receptor are mediated through two LXXLL motifs. J. Mol. Endocrinol. *32*, 843–857.

Dressing, G.E., Hagan, C.R., Knutson, T.P., Daniel, A.R., and Lange, C.A. (2009). Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. Endocr. Relat. Cancer *16*, 351–361.

Dressing, G.E., Knutson, T.P., Schiewer, M.J., Daniel, A.R., Hagan, C.R., Diep, C.H., Knudsen, K.E., and Lange, C.A. (2014). Progesterone receptor-cyclin D1 complexes induce cell cycledependent transcriptional programs in breast cancer cells. Mol. Endocrinol. *28*, 442–457.

Dunnwald, L.K., Rossing, M.A., and Li, C.I. (2007). Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. Breast Cancer Res. *9*, R6.

Ε

Eeckhoute, J., Carroll, J.S., Geistlinger, T.R., Torres-Arzayus, M.I., and Brown, M. (2006). A celltype-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. Genes Dev. *20*, 2513–2526.

Eeckhoute, J., Keeton, E.K., Lupien, M., Krum, S.A., Carroll, J.S., and Brown, M. (2007). Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. Cancer Res. *67*, 6477–6483.

Engin, A. (2017). Obesity-associated Breast Cancer: Analysis of risk factors. Adv. Exp. Med. Biol. *960*, 571–606.

Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., and Gustafsson, J.-Å. (1997). Human Estrogen Receptor β-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. J Clin Endocrinol Metab *82*, 4258–4265.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. Cancer Treat. Rev. *38*, 698–707.

Euhus, D.M., and Robinson, L. (2013). Genetic predisposition syndromes and their management. Surg. Clin. North Am. *93*, 341–362.

F

Faivre, E.J., Daniel, A.R., Hillard, C.J., and Lange, C.A. (2008). Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. Mol. Endocrinol. *22*, 823–837.

Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. Cancer Res *65*, 9328–9337.

Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O.M., DeMayo, F.J., Amato, P., and Lydon, J.P. (2005). Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. Semin. Reprod. Med. *23*, 22–37.

Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. EMBO J. *19*, 4688–4700.

Fontaine, R. (2014). Etude du système dopaminergique inhibiteur de la fonction gonadotrope chez le poisson-zèbre. Neurobiologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. ffNNT : 2014PA11T104ff. fftel-01419171

Foulkes, W.D., Stefansson, I.M., Chappuis, P.O., Bégin, L.R., Goffin, J.R., Wong, N., Trudel, M., and Akslen, L.A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. *95*, 1482–1485.

Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y.B., Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., et al. (2009). An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. Nature *462*, 58–64.

G

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int. J. Cancer *31*, 13–20.

Gilam, A., Shai, A., Ashkenazi, I., Sarid, L.A., Drobot, A., Bickel, A., and Shomron, N. (2017). MicroRNA regulation of progesterone receptor in breast cancer. Oncotarget *8*, 25963–25976.

Gill, G. (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes Dev. *18*, 2046–2059.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. Cell Stem Cell *1*, 555–567.

Godbole, M., Chandrani, P., Gardi, N., Dhamne, H., Patel, K., Yadav, N., Gupta, S., Badwe, R., and Dutt, A. (2017). miR-129-2 mediates down-regulation of progesterone receptor in response to progesterone in breast cancer cells. Cancer Biol. Ther. *18*, 801–805.

Göttlicher, M., Heck, S., and Herrlich, P. (1998). Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J. Mol. Med. *76*, 480–489.

Grimm, S.L., Hartig, S.M., and Edwards, D.P. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. J. Mol. Biol. *428*, 3831–3849.

Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., and Huber, J.C. (2002). Production and Actions of Estrogens. New England Journal of Medicine *346*, 340–352.

Guo, M., Wang, M., Deng, H., Zhang, X., and Wang, Z.-Y. (2013a). A novel anticancer agent Broussoflavonol B downregulates estrogen receptor (ER)- α 36 expression and inhibits growth of ER-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. Eur. J. Pharmacol. *714*, 56–64.

Guo, M., Wang, M., Zhang, X., Deng, H., and Wang, Z.-Y. (2013b). Broussoflavonol B restricts growth of ER-negative breast cancer stem-like cells. Anticancer Res. *33*, 1873–1879.

Haeuw, J.-F., Caussanel, V., and Beck, A. (2009). Les immunoconjugués, anticorps « armés » pour combattre le cancer. Med Sci (Paris) 25, 1046–1052.

Hagan, C.R., and Lange, C.A. (2014). Molecular determinants of context-dependent progesterone receptor action in breast cancer. BMC Med *12*, 32.

Hagan, C.R., Regan, T.M., Dressing, G.E., and Lange, C.A. (2011). ck2-dependent phosphorylation of progesterone receptors (PR) on Ser81 regulates PR-B isoform-specific target gene expression in breast cancer cells. Mol. Cell. Biol. *31*, 2439–2452.

Hagan, C.R., Knutson, T.P., and Lange, C.A. (2013). A Common Docking Domain in Progesterone Receptor-B links DUSP6 and CK2 signaling to proliferative transcriptional programs in breast cancer cells. Nucleic Acids Res. *41*, 8926–8942.

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

Hamilton, D.J., Minze, L.J., Kumar, T., Cao, T.N., Lyon, C.J., Geiger, P.C., Hsueh, W.A., and Gupte, A.A. (2016). Estrogen receptor alpha activation enhances mitochondrial function and systemic metabolism in high-fat-fed ovariectomized mice. Physiol Rep *4*.

Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Hay, D.C. (2010). Post-translational modification by SUMO. Toxicology *278*, 288–293.

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

Hill, K.K., Roemer, S.C., Churchill, M.E.A., and Edwards, D.P. (2012). Structural and Functional Analysis of Domains of the Progesterone Receptor. Mol Cell Endocrinol *348*, 418–429.

Hopp, T.A., Weiss, H.L., Hilsenbeck, S.G., Cui, Y., Allred, D.C., Horwitz, K.B., and Fuqua, S.A.W. (2004). Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. Clin. Cancer Res. *10*, 2751–2760.

Hou, J., Li, X., Li, C., Sun, L., Zhao, Y., Zhao, J., and Meng, S. (2015a). Plasma membrane gp96 enhances invasion and metastatic potential of liver cancer via regulation of uPAR. Mol Oncol *9*, 1312–1323.

Hou, J., Deng, M., Li, X., Liu, W., Chu, X., Wang, J., Chen, F., and Meng, S. (2015b). Chaperone gp96 mediates ER-α36 cell membrane expression. Oncotarget *6*, 31857–31867.

Hurtado, A., Holmes, K.A., Ross-Innes, C.S., Schmidt, D., and Carroll, J.S. (2011). FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. Nat. Genet. *43*, 27–33.

I

J

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

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

Jia, M., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *29*, 557–568.

Jiang, H., Teng, R., Wang, Q., Zhang, X., Wang, H., Wang, Z., Cao, J., and Teng, L. (2008). Transcriptional analysis of estrogen receptor alpha variant mRNAs in colorectal cancers and their matched normal colorectal tissues. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *112*, 20–24.

Johansson, L., Båvner, A., Thomsen, J.S., Färnegårdh, M., Gustafsson, J.A., and Treuter, E. (2000). The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors. Mol. Cell. Biol. *20*, 1124–1133.

Jones, M.E., Schoemaker, M.J., Wright, L.B., Ashworth, A., and Swerdlow, A.J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. Breast Cancer Res *19*.

Κ

Kang, L., Wang, L., and Wang, Z.-Y. (2011a). Opposite regulation of estrogen receptor- α and its variant ER- α 36 by the Wilms' tumor suppressor WT1. Oncol Lett *2*, 337–341.

Kang, L., Guo, Y., Zhang, X., Meng, J., and Wang, Z.-Y. (2011b). A positive cross-regulation of HER2 and ER-α36 controls ALDH1 positive breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *127*, 262–268.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J. *9*, 1603–1614.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. Lancet Oncol. 2, 133–140.

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

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. Cell *46*, 1053–1061.

Klinge, C.M., Riggs, K.A., Wickramasinghe, N.S., Emberts, C.G., McConda, D.B., Barry, P.N., and Magnusen, J.E. (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.

Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (2001). Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. J. Biol. Chem. *276*, 8475–8483.

Knutson, T.P., Truong, T.H., Ma, S., Brady, N.J., Sullivan, M.E., Raj, G., Schwertfeger, K.L., and Lange, C.A. (2017). Posttranslationally modified progesterone receptors direct ligand-specific expression of breast cancer stem cell-associated gene programs. J Hematol Oncol *10*, 89.

Koide, A., Zhao, C., Naganuma, M., Abrams, J., Deighton-Collins, S., Skafar, D.F., and Koide, S. (2007). Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor alpha that are important for modulating transactivation and protein-protein interactions. Mol. Endocrinol. *21*, 829–842.

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

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

Kumar, P., and Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. Arch. Gynecol. Obstet. *293*, 247–269.

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

L

Laganière, J., Deblois, G., Lefebvre, C., Bataille, A.R., Robert, F., and Giguère, V. (2005). From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 11651–11656.

Lattouf (2017). Crosstalk entre la kinase LKB1 et l'arginine methyltransferase PRMT5 dans le cancer du sein. Cancer. Université de Lyon, 2017. Français. NNT: 2017LYSE1252. tel-01688844

Lavery, D.N., and McEwan, I.J. (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. Biochem. J. *391*, 449–464.

Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S., and Corbo, L. (2008). Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. Mol. Cell *31*, 212–221. Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., and Corbo, L. (2011). Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. Endocr. Rev. *32*, 597–622.

Lee, H.-R., Kim, T.-H., and Choi, K.-C. (2012). Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ERα and ERβ, identified by estrogen receptor knockout mouse. Lab Anim Res *28*, 71–76.

Lee, L.M.J., Cao, J., Deng, H., Chen, P., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2008). ER-alpha36, a novel variant of ER-alpha, is expressed in ER-positive and -negative human breast carcinomas. Anticancer Res. *28*, 479–483.

Li, X., and O'Malley, B.W. (2003). Unfolding the action of progesterone receptors. J. Biol. Chem. *278*, 39261–39264.

Lieberman, B.A., Bona, B.J., Edwards, D.P., and Nordeen, S.K. (1993). The constitution of a progesterone response element. Mol. Endocrinol. 7, 515–527.

Lin, A.H.Y., Li, R.W.S., Ho, E.Y.W., Leung, G.P.H., Leung, S.W.S., Vanhoutte, P.M., and Man, R.Y.K. (2013). Differential Ligand Binding Affinities of Human Estrogen Receptor-a Isoforms. PLOS ONE *8*, 9.

Lin, S.-L., Yan, L.-Y., Zhang, X.-T., Yuan, J., Li, M., Qiao, J., Wang, Z.-Y., and Sun, Q.-Y. (2010). ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells via the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways. PLoS ONE *5*, e9013.

Liu, Y., Nguyen, N., and Colditz, G.A. (2015). Links between alcohol consumption and breast cancer: a look at the evidence. Womens Health (Lond) *11*, 65–77.

Lombès, M., Binart, N., Oblin, M.E., Joulin, V., and Baulieu, E.E. (1993). Characterization of the interaction of the human mineralocorticosteroid receptor with hormone response elements. Biochem. J. *292 (Pt 2)*, 577–583.

Loosfelt, H., Atger, M., Misrahi, M., Guiochon-Mantel, A., Meriel, C., Logeat, F., Benarous, R., and Milgrom, E. (1986). Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *83*, 9045–9049.

Lopez, F., Belloc, F., Lacombe, F., Dumain, P., Reiffers, J., Bernard, P., and Boisseau, M.R. (1991). Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. Cytometry *12*, 42–49.

Lowery, A.J., Miller, N., Devaney, A., McNeill, R.E., Davoren, P.A., Lemetre, C., Benes, V., Schmidt, S., Blake, J., Ball, G., et al. (2009). MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. Breast Cancer Res. *11*, R27.

Maczis, M.A., Maceyka, M., Waters, M.R., Newton, J., Singh, M., Rigsby, M.F., Turner, T.H., Alzubi, M.A., Harrell, J.C., Milstien, S., et al. (2018). Sphingosine kinase 1 activation by estrogen receptor α36 contributes to tamoxifen resistance in breast cancer. J. Lipid Res. *59*, 2297–2307.

Maillot, G., Lacroix-Triki, M., Pierredon, S., Gratadou, L., Schmidt, S., Bénès, V., Roché, H., Dalenc, F., Auboeuf, D., Millevoi, S., et al. (2009). Widespread estrogen-dependent repression of micrornas involved in breast tumor cell growth. Cancer Res. *69*, 8332–8340.

Mansoori, M., Madjd, Z., Janani, L., and Rasti, A. (2017). Circulating cancer stem cell markers in breast carcinomas: a systematic review protocol. Syst Rev *6*, 262.

Menasce, L.P., White, G.R.M., Harrison, C.J., and Boyle, J.M. (1993). Localization of the Estrogen Receptor Locus (ESR) to Chromosome 6q25.1 by FISH and a Simple Post-FISH Banding Technique. Genomics *17*, 263–265.

Meyer, M.E., Quirin-Stricker, C., Lerouge, T., Bocquel, M.T., and Gronemeyer, H. (1992). A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. J. Biol. Chem. *267*, 10882–10887.

Migliaccio, A., Piccolo, D., Castoria, G., Di Domenico, M., Bilancio, A., Lombardi, M., Gong, W., Beato, M., and Auricchio, F. (1998). Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. EMBO J. *17*, 2008–2018.

Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M.V., Ametrano, D., Zannini, M.S., Abbondanza, C., et al. (2000). Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. EMBO J. *19*, 5406–5417.

Mohammed, H., Russell, I.A., Stark, R., Rueda, O.M., Hickey, T.E., Tarulli, G.A., Serandour, A.A., Serandour, A.A., Birrell, S.N., Bruna, A., et al. (2015). Progesterone receptor modulates ERα action in breast cancer. Nature *523*, 313–317.

Muti, P., Donzelli, S., Sacconi, A., Hossain, A., Ganci, F., Frixa, T., Sieri, S., Krogh, V., Berrino, F., Biagioni, F., et al. (2018). MiRNA-513a-5p inhibits progesterone receptor expression and constitutes a risk factor for breast cancer: the hOrmone and Diet in the ETiology of breast cancer prospective study. Carcinogenesis *39*, 98–108.

Ν

Nardulli, A.M., Greene, G.L., O'Malley, B.W., and Katzenellenbogen, B.S. (1988). Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. Endocrinology *122*, 935–944.

0

Ohe, K., Miyajima, S., Abe, I., Tanaka, T., Hamaguchi, Y., Harada, Y., Horita, Y., Beppu, Y., Ito, F., Yamasaki, T., et al. (2018). HMGA1a induces alternative splicing of estrogen receptor alpha in MCF-7 human breast cancer cells. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology *182*, 21–26.

O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol. Endocrinol. *18*, 1859–1875.

Omarjee, S., Jacquemetton, J., Poulard, C., Rochel, N., Dejaegere, A., Chebaro, Y., Treilleux, I., Marangoni, E., Corbo, L., and Romancer, M.L. (2017). The molecular mechanisms underlying the ER α -36-mediated signaling in breast cancer. Oncogene *36*, 2503–2514.

Ortí, E., Bodwell, J.E., and Munck, A. (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. Endocr. Rev. *13*, 105–128.

Ρ

Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C., and Ali, S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. J. Biol. Chem. *272*, 25832–25838.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. Science *277*, 1508–1510.

Pan, X., Zhao, B., Song, Z., Han, S., and Wang, M. (2016). Estrogen receptor- α 36 is involved in epigallocatechin-3-gallate induced growth inhibition of ER-negative breast cancer stem/progenitor cells. J. Pharmacol. Sci. *130*, 85–93.

Park, J., and Lee, Y. (2017). Hypoxia induced phosphorylation of estrogen receptor at serine 118 in the absence of ligand. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *174*, 146–152.

Penot, G., Le Péron, C., Mérot, Y., Grimaud-Fanouillère, E., Ferrière, F., Boujrad, N., Kah, O., Saligaut, C., Ducouret, B., Métivier, R., et al. (2005). The Human Estrogen Receptor- α Isoform hER α 46 Antagonizes the Proliferative Influence of hER α 66 in MCF7 Breast Cancer Cells. Endocrinology *146*, 5474–5484.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747–752.

Piccolella, M., Crippa, V., Cristofani, R., Rusmini, P., Galbiati, M., Cicardi, M.E., Meroni, M., Ferri, N., Morelli, F.F., Carra, S., et al. (2017). The small heat shock protein B8 (HSPB8) modulates proliferation and migration of breast cancer cells. Oncotarget *8*, 10400–10415.

Pietras, R.J., and Szego, C.M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. Nature *265*, 69–72.

Ponglikitmongkol, M., Green, S., and Chambon, P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. EMBO J *7*, 3385–3388.

Popov, V.M., Wang, C., Shirley, L.A., Rosenberg, A., Li, S., Nevalainen, M., Fu, M., and Pestell, R.G. (2007). The functional significance of nuclear receptor acetylation. Steroids *72*, 221–230.

Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghou, K., Goddard-Léon, S., Chabaud, S., Trédan, O., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2012). Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. EMBO Mol Med *4*, 1200–1213.

Poulard, C., Rambaud, J., Hussein, N., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2014). JMJD6 regulates ERα methylation on arginine. PLoS ONE *9*, e87982.

Pourteimoor, V., Mohammadi-Yeganeh, S., and Paryan, M. (2016). Breast cancer classification and prognostication through diverse systems along with recent emerging findings in this respect; the dawn of new perspectives in the clinical applications. Tumour Biol. *37*, 14479–14499.

Proietti, C.J., Béguelin, W., Flaqué, M.C.D., Cayrol, F., Rivas, M.A., Tkach, M., Charreau, E.H., Schillaci, R., and Elizalde, P.V. (2011). Novel role of signal transducer and activator of transcription 3 as a progesterone receptor coactivator in breast cancer. Steroids *76*, 381–392.

Proietti, C.J., Izzo, F., Díaz Flaqué, M.C., Cordo Russo, R., Venturutti, L., Mercogliano, M.F., De Martino, M., Pineda, V., Muñoz, S., Guzmán, P., et al. (2015). Heregulin Co-opts PR Transcriptional Action Via Stat3 Role As a Coregulator to Drive Cancer Growth. Mol. Endocrinol. *29*, 1468–1485.

Putti, T.C., El-Rehim, D.M.A., Rakha, E.A., Paish, C.E., Lee, A.H.S., Pinder, S.E., and Ellis, I.O. (2005). Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. Mod. Pathol. *18*, 26–35.

Q

Qi, C., Chang, J., Zhu, Y., Yeldandi, A.V., Rao, S.M., and Zhu, Y.-J. (2002). Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. J. Biol. Chem. *277*, 28624–28630.

Quénel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., de Mascarel, I., Trojani, M., Durand, M., Avril, A., and Coindre, J.M. (1995). The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. Breast Cancer Res. Treat. *35*, 283–291.

R

Rakha, E.A., and Ellis, I.O. (2011). Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. Adv Anat Pathol *18*, 255–267.

Rakha, E.A., El-Sayed, M.E., Green, A.R., Paish, E.C., Powe, D.G., Gee, J., Nicholson, R.I., Lee, A.H.S., Robertson, J.F.R., and Ellis, I.O. (2007). Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. J. Clin. Oncol. *25*, 4772–4778.

Rao, J., Jiang, X., Wang, Y., and Chen, B. (2011). Advances in the understanding of the structure and function of ER-α36,a novel variant of human estrogen receptor-alpha. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *127*, 231–237.

Ravdin, P.M., Green, S., Dorr, T.M., McGuire, W.L., Fabian, C., Pugh, R.P., Carter, R.D., Rivkin, S.E., Borst, J.R., and Belt, R.J. (1992). Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. J. Clin. Oncol. *10*, 1284–1291.

Reyal, F., Hajage, D., Savignoni, A., Feron, J.-G., Bollet, M.A., Kirova, Y., Fourquet, A., Pierga, J.-Y., Cottu, P., Dieras, V., et al. (2013). Long-term prognostic performance of Ki67 rate in early stage, pT1-pT2, pN0, invasive breast carcinoma. PLoS ONE *8*, e55901.

Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature *445*, 111–115.

Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Manning, N.G., Abel, M.G., Wolf, D.M., and Horwitz, K.B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. J. Biol. Chem. *277*, 5209–5218.

Rosell, M., Nevedomskaya, E., Stelloo, S., Nautiyal, J., Poliandri, A., Steel, J.H., Wessels, L.F.A., Carroll, J.S., Parker, M.G., and Zwart, W. (2014). Complex formation and function of estrogen receptor α in transcription requires RIP140. Cancer Res. *74*, 5469–5479.

Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. Genes Dev. *20*, 1405–1428.

Rousseau-Merck, M.F., Misrahi, M., Loosfelt, H., Milgrom, E., and Berger, R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. Hum. Genet. 77, 280–282.

Rousset-Jablonski, C., and Gompel, A. (2017). Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. Maturitas *105*, 69–77.

Rubel, C.A., Lanz, R.B., Kommagani, R., Franco, H.L., Lydon, J.P., and DeMayo, F.J. (2012). Research resource: Genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus. Mol. Endocrinol. *26*, 1428–1442.

S

Sabbah, M., Courilleau, D., Mester, J., and Redeuilh, G. (1999). Estrogen induction of the cyclin D1 promoter: involvement of a cAMP response-like element. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 11217–11222.

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

Shen, Y., Zhong, J., Liu, J., Liu, K., Zhao, J., Xu, T., Zeng, T., Li, Z., Chen, Y., Ding, W., et al. (2018). Protein arginine N-methyltransferase 2 reverses tamoxifen resistance in breast cancer cells through suppression of ER-α36. Oncol. Rep. *39*, 2604–2612.

Shi, L., Dong, B., Li, Z., Lu, Y., Ouyang, T., Li, J., Wang, T., Fan, Z., Fan, T., Lin, B., et al. (2009). Expression of ER-{alpha}36, a novel variant of estrogen receptor {alpha}, and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. J. Clin. Oncol. *27*, 3423–3429.

Shi, Y.E., Chen, Y., Dackour, R., Potters, L., Wang, S., Ding, Q., Wang, Z., and Liu, Y.E. (2010). Synuclein gamma stimulates membrane-initiated estrogen signaling by chaperoning estrogen receptor (ER)-alpha36, a variant of ER-alpha. Am. J. Pathol. *177*, 964–973.

Shield, K.D., Soerjomataram, I., and Rehm, J. (2016). Alcohol Use and Breast Cancer: A Critical Review. Alcohol. Clin. Exp. Res. 40, 1166–1181.

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

Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. 9.

Skliris, G.P., Leygue, E., Curtis-Snell, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2006). Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. Br. J. Cancer *95*, 616–626.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 235, 177–182.

Song, R.X., Barnes, C.J., Zhang, Z., Bao, Y., Kumar, R., and Santen, R.J. (2004). The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 2076–2081.

Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001a). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 10869–10874.

Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001b). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 10869–10874.

Stendahl, M., Rydén, L., Nordenskjöld, B., Jönsson, P.E., Landberg, G., and Jirström, K. (2006). High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. Clin. Cancer Res. *12*, 4614–4618. Stender, J.D., Nwachukwu, J.C., Kastrati, I., Kim, Y., Strid, T., Yakir, M., Srinivasan, S., Nowak, J., Izard, T., Rangarajan, E.S., et al. (2017). Structural and Molecular Mechanisms of Cytokine-Mediated Endocrine Resistance in Human Breast Cancer Cells. Molecular Cell *65*, 1122-1135.e5.

Stevenson, J.C. (2011). A woman's journey through the reproductive, transitional and postmenopausal periods of life: Impact on cardiovascular and musculo-skeletal risk and the role of estrogen replacement. Maturitas *70*, 197–205.

Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., and Wahl, G.M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. EMBO J. *18*, 1660–1672.

Su, X., Xu, X., Li, G., Lin, B., Cao, J., and Teng, L. (2014). ER-α36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer. Onco Targets Ther *7*, 1525–1533.

Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D.R., Collins, R.E., Sharma, D., Peng, J., Cheng, X., and Vertino, P.M. (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. Mol. Cell *30*, 336–347.

Т

Takimoto, G.S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M.G., Sartorius, C.A., Richer, J.K., Jacobsen, B.M., Bain, D.L., and Horwitz, K.B. (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *85*, 209–219.

Thiebaut, C., Chamard-Jovenin, C., Chesnel, A., Morel, C., Djermoune, E.-H., Boukhobza, T., and Dumond, H. (2017). Mammary epithelial cell phenotype disruption in vitro and in vivo through ERalpha36 overexpression. PLoS ONE *12*, e0173931.

Thiebaut, C., Chesnel, A., Merlin, J.-L., Chesnel, M., Leroux, A., Harlé, A., and Dumond, H. (2019). Dual Epigenetic Regulation of ERα36 Expression in Breast Cancer Cells. Int J Mol Sci 20.

Thor, A.D., Berry, D.A., Budman, D.R., Muss, H.B., Kute, T., Henderson, I.C., Barcos, M., Cirrincione, C., Edgerton, S., Allred, C., et al. (1998). erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. *90*, 1346–1360.

Toft, D., and Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *55*, 1574–1581.

Tong, J.-S., Zhang, Q.-H., Wang, Z.-B., Li, S., Yang, C.-R., Fu, X.-Q., Hou, Y., Wang, Z.-Y., Sheng, J., and Sun, Q.-Y. (2010). ER- α 36, a novel variant of ER- α , mediates estrogen-stimulated proliferation of endometrial carcinoma cells via the PKC δ /ERK pathway. PLoS ONE *5*, e15408.

Trivedi, S., Piccart, M., Muquardt, C., Gilot, N., Hadiy, S., Patel, D., and Leclercq, G. (1996). Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. Breast Cancer Res. Treat. *40*, 231–241. Tsai, E.M., Wang, S.C., Lee, J.N., and Hung, M.C. (2001). Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells. Cancer Res. *61*, 8390–8392.

Tung, L., Mohamed, M.K., Hoeffler, J.P., Takimoto, G.S., and Horwitz, K.B. (1993). Antagonistoccupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. Mol. Endocrinol. *7*, 1256–1265.

U, V

Umayahara, Y., Kawamori, R., Watada, H., Imano, E., Iwama, N., Morishima, T., Yamasaki, Y., Kajimoto, Y., and Kamada, T. (1994). Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. J. Biol. Chem. *269*, 16433–16442.

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., and McDonnell, D.P. (1993). Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. Mol. Endocrinol. *7*, 1244–1255.

Vicent, G.P., Nacht, A.S., Zaurín, R., Ballaré, C., Clausell, J., and Beato, M. (2010). Minireview: role of kinases and chromatin remodeling in progesterone signaling to chromatin. Mol. Endocrinol. *24*, 2088–2098.

Vicent, G.P., Nacht, A.S., Zaurin, R., Font-Mateu, J., Soronellas, D., Le Dily, F., Reyes, D., and Beato, M. (2013). Unliganded progesterone receptor-mediated targeting of an RNA-containing repressive complex silences a subset of hormone-inducible genes. Genes Dev. *27*, 1179–1197.

Vo, N., Fjeld, C., and Goodman, R.H. (2001). Acetylation of nuclear hormone receptorinteracting protein RIP140 regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. Mol. Cell. Biol. *21*, 6181–6188.

Vranic, S., Gatalica, Z., Deng, H., Frkovic-Grazio, S., Lee, L.M.J., Gurjeva, O., and Wang, Z.-Y. (2011). ER- α 36, a novel isoform of ER- α 66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast. J. Clin. Pathol. *64*, 54–57.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., and Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. Biochem Med (Zagreb) 24, 329–342.

W

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., and Waterfield, M. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences *82*, 7889–7893.

Wang, C., Fu, M., Angeletti, R.H., Siconolfi-Baez, L., Reutens, A.T., Albanese, C., Lisanti, M.P., Katzenellenbogen, B.S., Kato, S., Hopp, T., et al. (2001). Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. J. Biol. Chem. *276*, 18375–18383.

Wang, D., Huang, P., Zhu, B., Sun, L., Huang, Q., and Wang, J. (2012a). Induction of estrogen receptor α -36 expression by bone morphogenetic protein 2 in breast cancer cell lines. Mol Med Rep *6*, 591–596.

Wang, J., Li, J., Fang, R., Xie, S., Wang, L., and Xu, C. (2012b). Expression of ERα36 in gastric cancer samples and their matched normal tissues. Oncol Lett *3*, 172–175.

Wang, L., Li, H., Yang, S., Ma, W., Liu, M., Guo, S., Zhan, J., Zhang, H., Tsang, S.Y., Zhang, Z., et al. (2016). Cyanidin-3-o-glucoside directly binds to ER α 36 and inhibits EGFR-positive triple-negative breast cancer. Oncotarget *7*, 68864–68882.

Wang, Q., Zhang, W., Yang, J., Liu, Y.-L., Yan, Z.-X., Guo, Z.-J., Li, Y.-J., and Bian, X.-W. (2015). High ER α 36 Expression Level and Membrane Location Predict Poor Prognosis in Renal Cell Carcinoma. Medicine (Baltimore) *94*, e1048.

Wang, Q., Jiang, J., Ying, G., Xie, X.-Q., Zhang, X., Xu, W., Zhang, X., Song, E., Bu, H., Ping, Y.-F., et al. (2018). Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ERα36+ breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. Cell Res. *28*, 336–358.

Wang, X., Deng, H., Zou, F., Fu, Z., Chen, Y., Wang, Z., and Liu, L. (2013). ER-α36-mediated gastric cancer cell proliferation via the c-Src pathway. Oncol Lett *6*, 329–335.

Wang, X., Zheng, N., Dong, J., Wang, X., Liu, L., and Huang, J. (2017). Estrogen receptor-α36 is involved in icaritin induced growth inhibition of triple-negative breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. *171*, 318–327.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2005). Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α 66. Biochemical and Biophysical Research Communications *336*, 1023–1027.

Wang, Z., Zhang, X., Shen, P., Loggie, B.W., Chang, Y., and Deuel, T.F. (2006). A variant of estrogen receptor-{alpha}, hER-{alpha}36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 9063–9068.

Ward, R.D., and Weigel, N.L. (2009). Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. Biofactors *35*, 528–536.

Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., and Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. Mol. Endocrinol. *9*, 443–456.

Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Lopez, G.N., Kwok, G.R., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Enmark, E., Gustafsson, J.A., Nilsson, S., et al. (1999). The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. Mol. Endocrinol. *13*, 1672–1685.

Wei, L.L., Gonzalez-Aller, C., Wood, W.M., Miller, L.A., and Horwitz, K.B. (1990). 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. Mol. Endocrinol. *4*, 1833–1840.

Wei, L.N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E., and Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. J. Biol. Chem. *275*, 40782–40787.

Weigelt, B., Peterse, J.L., and van 't Veer, L.J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. Nat. Rev. Cancer *5*, 591–602.

Weitsman, G.E., Li, L., Skliris, G.P., Davie, J.R., Ung, K., Niu, Y., Curtis-Snell, L., Tomes, L., Watson, P.H., and Murphy, L.C. (2006). Estrogen receptor-alpha phosphorylated at Ser118 is present at the promoters of estrogen-regulated genes and is not altered due to HER-2 overexpression. Cancer Res. *66*, 10162–10170.

Welcsh, P.L. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. Human Molecular Genetics *10*, 705–713.

Winters, S., Martin, C., Murphy, D., and Shokar, N.K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In Progress in Molecular Biology and Translational Science, (Elsevier), pp. 1–32.

Wood, W.C., Budman, D.R., Korzun, A.H., Cooper, M.R., Younger, J., Hart, R.D., Moore, A., Ellerton, J.A., Norton, L., and Ferree, C.R. (1994). Dose and dose intensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. *330*, 1253–1259.

Wunderle, M., Pretscher, J., Brucker, S.Y., Volz, B., Hartmann, A., Fiessler, C., Hein, A., Häberle, L., Jud, S.M., Lux, M.P., et al. (2019). Association between breast cancer risk factors and molecular type in postmenopausal patients with hormone receptor-positive early breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. *174*, 453–461.

Χ

Υ

Yen, P.M., Liu, Y., Palvimo, J.J., Trifiro, M., Whang, J., Pinsky, L., Jänne, O.A., and Chin, W.W. (1997). Mutant and wild-type androgen receptors exhibit cross-talk on androgen-, glucocorticoid-, and progesterone-mediated transcription. Mol. Endocrinol. *11*, 162–171.

Yi, P., Wang, Z., Feng, Q., Pintilie, G.D., Foulds, C.E., Lanz, R.B., Ludtke, S.J., Schmid, M.F., Chiu, W., and O'Malley, B.W. (2015). Structure of a biologically active estrogen receptor-coactivator complex on DNA. Mol. Cell *57*, 1047–1058.

Yin, L., Zhang, X.-T., Bian, X.-W., Guo, Y.-M., and Wang, Z.-Y. (2014). Disruption of the ER- α 36-EGFR/HER2 positive regulatory loops restores tamoxifen sensitivity in tamoxifen resistance breast cancer cells. PLoS ONE *9*, e107369.

Yin, L., Pan, X., Zhang, X.-T., Guo, Y.-M., Wang, Z.-Y., Gong, Y., and Wang, M. (2015). Downregulation of ER- α 36 expression sensitizes HER2 overexpressing breast cancer cells to tamoxifen. Am J Cancer Res *5*, 530–544.

Yin, P., Roqueiro, D., Huang, L., Owen, J.K., Xie, A., Navarro, A., Monsivais, D., Coon, J.S., Kim, J.J., Dai, Y., et al. (2012). Genome-wide progesterone receptor binding: cell type-specific and shared mechanisms in T47D breast cancer cells and primary leiomyoma cells. PLoS ONE *7*, e29021.

Yu, Z., Pestell, T.G., Lisanti, M.P., and Pestell, R.G. (2012). Cancer stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology *44*, 2144–2151.

Yue, X., Lu, M., Lancaster, T., Cao, P., Honda, S.-I., Staufenbiel, M., Harada, N., Zhong, Z., Shen, Y., and Li, R. (2005). Brain estrogen deficiency accelerates Aβ plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 19198–19203.

Ζ

Zaret, K.S., and Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. Genes Dev. *25*, 2227–2241.

Zassadowski, F., Rochette-Egly, C., Chomienne, C., and Cassinat, B. (2012). Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. Cell. Signal. *24*, 2369–2377.

Zhang, S., Qiu, C., Wang, L., Liu, Q., and Du, J. (2014). The elevated level of ERα36 is correlated with nodal metastasis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. Steroids *87*, 39–45.

Zhang, X., Ding, L., Kang, L., and Wang, Z.-Y. (2012). Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. PLoS ONE *7*, e30174.

Zhang, X., Peng, D., Xi, Y., Yuan, C., Sagum, C.A., Klein, B.J., Tanaka, K., Wen, H., Kutateladze, T.G., Li, W., et al. (2016). G9a-mediated methylation of ERα links the PHF20/MOF histone acetyltransferase complex to hormonal gene expression. Nat Commun *7*, 10810.

Zhang, X.T., Kang, L.G., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z., and Wang, Z.-Y. (2011). A positive feedback loop of $ER-\alpha36/EGFR$ promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. Oncogene *30*, 770–780.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1994). Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. J. Biol. Chem. *269*, 31034–31040.

Zhang, Y., Beck, C.A., Poletti, A., Clement, J.P., Prendergast, P., Yip, T.T., Hutchens, T.W., Edwards, D.P., and Weigel, N.L. (1997). Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. Mol. Endocrinol. *11*, 823–832.

Zhao, C., Dahlman-Wright, K., and Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor beta: an overview and update. Nucl Recept Signal *6*, e003.

Zhong, Q., Peng, H.-L., Zhao, X., Zhang, L., and Hwang, W.-T. (2015). Effects of BRCA1- and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis. Clin. Cancer Res. *21*, 211–220.

Zhu, H., Huang, Y., Su, H., Ma, Y., Tao, Y., Liao, D.J., Liu, Y., and Feng, Z. (2018a). Identification of a novel human estrogen receptor- α splice variant able to enhance malignant biological behaviors of breast cancer cells. Oncol Lett *15*, 5339–5344.

Zhu, L., Zou, J., Zhao, Y., Jiang, X., Wang, Y., Wang, X., and Chen, B. (2018b). ER-α36 mediates cisplatin resistance in breast cancer cells through EGFR/HER-2/ERK signaling pathway. J. Exp. Clin. Cancer Res. *37*, 123.

Zou, Y., Ding, L., Coleman, M., and Wang, Z. (2009). Estrogen receptor-alpha (ER-alpha) suppresses expression of its variant ER-alpha 36. FEBS Lett. *583*, 1368–1374.